DIE CHROMATOGRAPHISCHE ADSORPTIONSMETHODE

GRUNDLAGEN · METHODIK · ANWENDUNGEN

VON

DR. L. ZECHMEISTER UND DR. L. v. CHOLNOKY
PROFESSOR PRIVATDOZENT
AM CHEMISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT PÉCS (UNGARN)

MIT 45 ABBILDUNGEN



WIEN
VERLAG VON JULIUS SPRINGER
1937

PRINTED IN AUSTRIA

Vorwort.

„Jeder wissenschaftliche Fortschritt
ist ein Fortschritt der Methode."

Ein neu entdecktes spezielles Laboratoriumsverfahren erobert in rascher Folge wissenschaftliche und technische Gebiete, bis es sich schließlich erschöpft und von einem leistungsfähigeren Arbeitsgang abgelöst wird. Die von dem genialen russischen Botaniker Professor M. TSWETT ersonnene *„Chromatographische Adsorptionsmethode"*, welche das räumlich getrennte Festhalten von Bestandteilen eines Gemisches erlaubt, befindet sich gerade jetzt am Beginn einer glänzenden Entfaltung: sie bietet dem Forscher einfache experimentelle Hilfsmittel, namentlich auf dem Gebiet der reinen sowie angewandten organischen Chemie, der Biochemie und Physiologie.

In der Hoffnung, zum weiteren Durchdringen der noch immer nicht gebührend anerkannten Methodik etwas beizutragen, veröffentlichen wir die vorliegende kurze Monographie, welche aus zwei Teilen besteht. Es werden zunächst die allgemeinen Grundlagen sowie die Ausführungsformen der Chromatographie besprochen, worauf, in einem bewußt unvollständigen „Speziellen Teil", Anwendungsbeispiele folgen. Die zusammengestellten Versuchsvorschriften erstrecken sich auf sehr verschiedenartige Körperklassen und dürften im Hinblick auf die recht unübersichtliche Lage der Literatur nützlich sein. Wenn das behandelte Gebiet mit der erwünschten Geschwindigkeit sich weiter entwickelt, so wird in absehbarer Zeit ein erschöpfender Bericht ebensowenig zu schreiben sein, wie heute ein Referat z. B. über die Anwendung von Destillations- oder Umscheidungsmethoden.

Bei der Zusammenstellung des Manuskriptes wurden wir von den folgenden Herren durch Hinweise und Auskünfte unterstützt, wofür auch hier gedankt sei: H. BROCKMANN (Göttingen), CH. DHÉRÉ (Fribourg), A. v. GORKA (Pécs), A. E. GILLAM (Manchester),

I. M. HEILBRON (Manchester), P. KARRER (Zürich), R. KUHN (Heidelberg), E. LEDERER (Leningrad), W. RUHLAND (Leipzig), A. STOLL (Basel), G. TÓTH (Pécs), P. TUZSON (Pécs), J. WALDENSTRÖM (Uppsala), R. WILLSTÄTTER (München) und A. WINTERSTEIN (Basel).

Blättert man im nachfolgenden Text, so dürfte öfters der Eindruck entstehen, daß nicht die festgelegten Ergebnisse am interessantesten sind, sondern die zahlreichen Lücken, von welchen man in theoretischer oder praktischer Richtung zur Weiterarbeit angeregt wird.

Pécs, im Dezember 1936.

Die Verfasser.

Inhaltsübersicht.

Seite

Allgemeiner Teil.

Spezieller Teil.

Verzeichnis der Tabellen.

Verzeichnis der Abbildungen.

Allgemeiner Teil.

Erstes Kapitel.

Grundlagen.

„Wie die Lichtstrahlen im Spektrum, so werden in der Calciumcarbonat-Säule die verschiedenen Komponenten eines Farbstoffgemisches gesetzmäßig auseinandergelegt und lassen sich dann qualitativ und quantitativ bestimmen.“ (*Tswett*)

Überblickt man den Werdegang der organischen Chemie und der Biochemie, so fällt auf, wie oft eine gewaltige Steigerung der Arbeitsmöglichkeiten von *physikalischer* Seite ausgegangen ist. Man denke nur an die Förderung, welche der Ausbau der erwähnten Wissenszweige durch polarimetrische, refraktometrische Methoden, durch die im Sichtbaren und Unsichtbaren vorgenommene Spektroskopie empfangen hat. Es läßt sich sagen, daß für die Verarbeitung von hochempfindlichen Stoffen überhaupt nur physikalische Wege offenstehen.

Es dürfte weniger allgemein bekannt sein, daß das Studium von organischen Farbstoffen und später auch der farblosen und schwachgefärbten Kohlenstoffverbindungen durch eine originelle, von Tswett 1906 veröffentlichte *Ausführungsform der Adsorptionsanalyse* in früher ungeahntem Maße erleichtert wurde. Diese als „*chromatographisches Verfahren*“, kurz „*Chromatographie*“ bezeichnete, einfache Methodik sowie ein Abriß der von der Tswettschen Idee ausgelösten wissenschaftlichen Bewegung bildet den Inhalt der vorliegenden Schrift.

Schüttelt man die gemeinsame Lösung von mehreren, stark gefärbten Verbindungen mit einem geeigneten Adsorbens, so findet, je nach den Mengenverhältnissen und den Adsorptionskoeffizienten,

eine Verteilung zwischen den beiden Phasen statt. Günstige Bedingungen vorausgesetzt, werden die einzelnen Farbstoffe mehr oder weniger tief in das Adsorptionsmittel eindringen und sich dort anreichern. Das Adsorbat ist dann ein Gemisch, zu dessen Zerlegung kein einfacher Weg zur Verfügung steht. Ganz anders, nämlich viel günstiger liegen jedoch die Verhältnisse, falls die *Durchströmung des Adsorbens nur in einer, definierten Richtung* erfolgt.

In seiner grundlegenden Versuchsreihe goß TSWETT den petrolätherischen, aus grünen Blättern bereiteten Auszug auf eine, in ein vertikal gestelltes Glasrohr eingestampfte *Säule* von pulverförmigem Calciumcarbonat und stellte fest, daß der scheinbar homogene Pigmentinhalt der allmählich durchsickernden Lösung sich alsbald *zerlegt*: im oberen Säulenteil erschien eine gelbe Scheibe, knapp darunter sah man zwei grüngefärbte Zonen, während drei andere, gelbe Komponenten weiter nach unten vorgedrungen sind und erst in den tiefer liegenden Bezirken des Carbonats hängen blieben. Noch viel schöner gestaltet sich das „*Chromatogramm*“, wenn man beträchtliche Mengen des reinen Lösungsmittels nachgießt. So wird das Bild „entwickelt“: weiße Zwischenräume erscheinen und verbreitern sich, indem die einzelnen Farbstoffkomponenten mit ungleichen Geschwindigkeiten nach unten wandern. Eine gelbe Verbindung (Carotin) passierte die ganze Kolonne und gelangte in das Filtrat.

Die zusammengesetzte Natur des Chlorophylls und des Blattgelbs war damit bewiesen und die Art der Bestandteile richtig erkannt (Abb. 1, S. 3).

Nun zerschnitt TSWETT die Säule und löste die individuellen Farbstoffe einzeln heraus, z. B. durch Zufügen von Sprit. Nachdem das entfärbte Adsorbens aus den getrennten Anteilen durch Filtration ausgeschaltet wurde, standen die einheitlichen Pigmentlösungen zur Spektroskopie sowie zur chemischen Untersuchung bereit. So verwirklicht sich ein Wunschtraum des Chemikers: Stoffe, die früher im Gemisch vorlagen, werden mit dem Messer voneinander geschieden.

Der einfache chromatographische Versuch besteht demnach aus den folgenden Operationen:

Vorbereitung der Säule, durch Einstampfen des Adsorptionsmittels.

Aufgießen der zu untersuchenden Lösung.

Entwickeln zum fertigen Chromatogramm, durch Einführung eines Lösungsmittels.

Auspressen der Säule aus dem Rohr.

Zerschneiden der Säule, entsprechend den ausgebildeten Schichten.

Elution der einzelnen Säulenteile.

Entfernen des leeren, nun pulvrigen Adsorptionsmittels durch Filtration.

Weitere Verarbeitung der einzelnen Filtrate (physikalische Messungen, Isolierung des Stoffinhaltes, Elementaranalyse usw.).

Selbstredend kann der Arbeitsgang in mannigfacher Weise abgeändert werden, worauf wir noch zurückkommen. Wie man aber auch die Ausführungsform variieren mag, zeigen sich entscheidende *Vorteile* gegenüber dem klassischen Verfahren, das im Schütteln einer Lösung mit pulverförmigem Adsorbens besteht. Nach der älteren Methode bleibt man nämlich bis zum Schlusse des Adsorptionsvorganges nur mangelhaft orientiert, während ein Blick auf das Chromatogramm genügen wird, um den jeweiligen Stand der Versuchslage festzustellen.

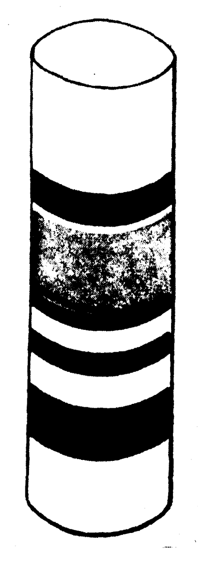


Abb. 1. Chromatogramm eines Blattauszuges nach TSWETT (Zonen im farbigen Original von oben nach unten: blaßgelb [in der Wiedergabe unsichtbar], grün, breit grünlichblau, gelb, gelb, gelb).

Ganz besonders tritt die Überlegenheit der Chromatographie hervor, wenn man bedenkt, bis zu welchem Grade eine Aufteilung möglich ist:

Schütteln mit dem Adsorbens → Gesamtadsorbat
→ Nicht adsorbiertes (in Lösung)

TSWETT*sche Adsorptionsmethode*
→ Komponente mit der stärksten Adsorptionsaffinität
→ Komponente mit der zweitstärksten Adsorptionsaffinität
→ Komponente mit der drittstärksten Adsorptionsaffinität usw.
→ Nicht adsorbiertes (durch die Säule gelaufen: Filtrat)

Während also im Schüttelverfahren zunächst nur eine Zweiteilung erreichbar ist, gelangt man auf chromatographischem Wege sofort zu einer viel feineren Fraktionierung. In verwickelten Fällen kann das Chromatogramm aus Dutzenden von Schichten bestehen (Abb. 44, S. 196).

Die Grenzlinie zwischen den beiden Methoden wird indessen weniger scharf, wenn man das *Gesamtadsorbat anteilsweise eluiert*, also das Pulver bzw. die nicht zerschnittene Adsorptionssäule zunächst mit einem schwächeren, dann nacheinander mit immer stärker wirksamen Elutionsflüssigkeiten behandelt. So lassen sich in günstigem Falle die Bestandteile des fixierten Stoffvorrates einzeln ablösen. Aber auch dann ist der Gebrauch der TSWETTschen Kolonne bequem, aus welcher das Eluat selbsttätig abfließt.

Ein Übergang zwischen den beiden Hauptausführungsformen der Adsorptionsanalyse besteht ferner darin, daß man keine schlanke Säule baut, sondern das Pulver auf eine Nutsche schichtet und dort die fraktionierte Elution vornimmt. Allerdings muß man dann auf eine visuelle Verfolgung der im Adsorbens sich abspielenden Vorgänge meist verzichten.

Anwendungsbereich.

Es ist eine selbstverständliche Voraussetzung für die Anwendbarkeit der Chromatographie, daß die in der Säule festgehaltene Substanz keine chemische Änderung während der Adsorption erleide. Diese Forderung ist in einer überraschend großen Anzahl von Fällen tatsächlich erfüllt, doch sind der Methode natürlich auch gewisse *Grenzen* gesteckt. Vor allem kann es vorkommen, daß das basische oder saure Adsorbens z. B. unter Bildung oder Zerlegung eines Salzes reagiert. Diese reversiblen Vorgänge sind meist wenig störend, wenn sie richtig erkannt wurden.

Gelegentlich der Verarbeitung von Organauszügen haben wir manchmal beobachtet, daß die Lösung in der Kolonne aschehaltig wird; betreffend Al_2O_3 s. die Angaben von EULER und SCHLENK.

Bei empfindlichen Stoffen kann es aber auch vorkommen, daß die Substanz, namentlich, wenn nicht rasch genug gearbeitet wird, in der Adsorptionssäule *verdirbt*. So läßt sich z. B. das Chlorophyll auf Puderzucker sehr gut chromatographieren, es erfolgt jedoch teilweise Zersetzung, wenn man Talcum nimmt (WINTERSTEIN und STEIN 2). GRASSMANN hat beobachtet, daß die Fluorescenzerschei-

nungen von chromatographisch festgehaltenen Gerbstoffextrakten innerhalb 1—2 Tagen sich bedeutend ändern können. Nach RUGGLI und JENSEN (1) tritt bei gewissen Triphenylmethanfarbstoffen in der Aluminiumoxyd-Säule eine Aufhellung ein, offenbar infolge einer allmählich fortschreitenden Hydrolyse. An Aluminiumoxyd, aus schwach saurer Lösung adsorbierte Pterine werden an der Oberfläche des Adsorbens rasch zerstört; auf Frankonit sind sie stabil (SCHÖPF und BECKER).

Im Speziellen Teil wird auf S. 93 die partielle *Isomerisation* von Carotin unter der Einwirkung von Adsorptionsmitteln ausführlich besprochen (GILLAM und EL RIDI 1—3), ebenso auch auf S. 178 das Auftreten von farbigen Zonen während der Adsorption von Vitamin-A-Konzentraten (nach CASTLE, GILLAM, HEILBRON und THOMPSON). Daß cis-trans-Umlagerungen in der Säule möglich sind, folgt z. B. aus der Arbeit von TAYLOR und LAVINGTON.

Es sei hier betont, daß von den soeben erwähnten Grenzlinien ein ungeheures Gebiet der glatten Anwendbarkeit der Chromatographie umrahmt wird.

Ohne noch auf methodische Griffe einzugehen, seien die chromatographisch derzeit lösbaren *Hauptaufgaben* kurz besprochen, um zu zeigen, in welchem Umfang die übliche organisch-chemische Laboratoriumstechnik mit Hilfe des TSWETTschen Verfahrens gefördert und vereinfacht werden konnte. Dies ist namentlich auf folgenden Gebieten der Fall:

a) Prüfung eines Stoffes auf Einheitlichkeit.

b) Feststellung der Identität bzw. der Verschiedenheit von zwei Verbindungen.

c) Anreicherung eines in sehr großer Verdünnung vorliegenden Naturproduktes.

d) Zerlegung eines Gemisches. Nachweis, Bestimmung und Isolierung der Komponenten.

e) Reinigung einer Substanz, z. B. eines technischen Produktes von Begleitern.

f) Kennzeichnung und Kontrolle von Handelswaren.

a) Prüfung eines Stoffes auf Einheitlichkeit.

Eine Substanz ist in chromatographischem Sinne einheitlich, wenn sie in der Adsorptionssäule sich nicht zerlegen läßt.

Diese Homogenität bedeutet in außerordentlich zahlreichen Fällen wirklich chemische Reinheit, da — nach der bisherigen Erfahrung — die Stärke der Adsorptionsaffinitäten in weit höherem Maße von dem Molekülbau abhängt, als die zur Einheitlichkeitsprüfung meist herangezogenen Merkmale, wie Schmelzpunkt, Siedepunkt, Spektrum u. dgl. Namentlich sind die *Löslichkeitsunterschiede von nahe verwandten chemischen Individuen geringfügiger als die Differenzen in der Adsorbierbarkeit.*

Man sollte daher fraktionierte Krystallisationen, wo nur tunlich, durch einen chromatographischen Versuch ersetzen.

Wegen der hohen Selektivität der Oberflächenkräfte erzielt man nach dem TSWETTschen Prinzip sehr oft auch dort eine Aufteilung, wo die übliche Technik versagt hat. Nicht selten stellt es sich auch heraus, daß „reine" Handelschemikalien weit davon entfernt sind, chromatographisch einheitlich zu sein. Je mehr Schritte bei der Fabrikation erforderlich waren, eine um so größere Wahrscheinlichkeit spricht für die Heterogenität des Endproduktes.

Über die *Grenzen* der Einheitlichkeitsprobe sei hier folgendes angeführt.

Es gibt natürlich Fälle, in denen zwei Verbindungen praktisch die gleiche Adsorptionsaffinität besitzen und sich in der Säule nicht trennen lassen. Die Zuverlässigkeit der Analyse kann jedoch nach einem negativen Ergebnis gesteigert werden, wenn die Zerlegung aus verschiedenen Lösungsmitteln und an mehreren Adsorbenten versucht wird. Denn es wäre, wie bereits TSWETT (1) bemerkt, recht unwahrscheinlich, daß die Adsorptionsisothermen von zwei Stoffen sich streng gleichartig ändern würden, falls man das Milieu und die adsorbierende Phase beliebig variiert.

Die Einheitlichkeitsprobe läßt sich übrigens noch etwas weiter treiben, wenn man die sich nicht aufteilende Scheibe dennoch in mehrere Regionen zerschneidet, welche dann nach physikalischen oder chemischen Methoden einzeln geprüft werden. Es kommt nämlich vor, daß die verschiedene Adsorbierbarkeit zwar die Teilung des Materials veranlaßt, aber zur Ausbildung einer leeren Zwischenschicht nicht reicht.

In anderen Grenzfällen begegnet man der Schwierigkeit, daß ein einheitlicher Stoff dennoch ein heterogenes Bild in der Säule liefert. Hierzu führt z. B. die oben erwähnte, manchmal vorkommende Bildung oder Zersetzung eines Salzes, wie dies z. B.

auf S. 146 nach KARRER und STRONG für Anthocyane gezeigt wird. Aus physikalischen Gründen ist chromatographische Uneinheitlichkeit bei stark polydispersen Farbstofflösungen zu erwarten, doch steht eine genauere Prüfung solcher Verhältnisse noch aus.

Scheinbare Heterogenität, S. 139.

b) Feststellung der Identität bzw. der Verschiedenheit von zwei Verbindungen.

Ist die Frage nach der Identität zu entscheiden, so bereitet man eine gemeinsame Lösung der beiden Stoffe, welche adsorptionsanalytisch geprüft wird. Es ist dann ohne weiteres ersichtlich, ob das Chromatogramm nur aus einer einzigen Zone besteht oder ob eine Zweiteilung des Gemenges stattgefunden hat. Das „*Misch-chromatogramm*“ ist der Bestimmung des Mischschmelzpunktes an die Seite zu stellen, und sie erfordert in günstigen Fällen kaum mehr Substanz als jene altbewährte Identitätsprobe.

c) Anreicherung eines in sehr großer Verdünnung vorliegenden Naturproduktes.

Bei biochemischen Untersuchungen leistet wohl kein Arbeitsgang in dieser Hinsicht mehr als das chromatographische Verfahren. Man läßt mehrere Liter oder Hektoliter Lösung durch eine entsprechend gewählte, relativ kleine Säule sickern und verwirft das Filtrat. So wird der Versuchsmaßstab mit einem Schlage verkleinert, ohne daß ein langwieriges und bei empfindlichen Substanzen bedenkliches Eindampfen nötig gewesen wäre.

Meist wird man das gesamte hängengebliebene Material zunächst ohne weitere Aufteilung eluieren, zwecks Vornahme einer genaueren Prüfung, oder man löst die Komponenten anteilsweise heraus. Das Konzentrat wird adsorptionsanalytisch oder nach einer anderen Methode verarbeitet.

Beispiel. Isolierung von Farbstoffen aus 5000 l Harn, nach KOSCHARA (1—5), S. 136.

d) Zerlegung eines Gemisches. Nachweis, Bestimmung und Isolierung der Komponenten.

Diese Hauptrichtung der Chromatographie ermöglicht die Lösung von sehr verschiedenartigen Aufgaben, und sie umfaßt eine

mannigfaltige Versuchstechnik, die an dieser Stelle nur kurz umrissen werden soll.

Bekanntlich arbeitet die organisch-analytische Chemie in steigendem Maße mit *kleinen Substanzmengen*. Der gewaltige Anstoß, den die Einführung der PREGLschen Mikroanalyse namentlich der Biochemie gegeben hat, wirkt sich in fruchtbarer Weise derart aus, daß zur quantitativen Ermittlung des Molekulargewichtes sowie einer Anzahl von Elementen und Atomgruppen nur mehr wenige Milligramme Substanz notwendig sind. Das moderne Rüstzeug der Mikroanalyse konnte indessen nicht voll ausgenutzt werden, solange kein allgemeines Verfahren weiteren Kreisen bekannt war, zur präparativen Reindarstellung von geringen Stoffmengen bzw. zu deren Abtrennung von ähnlichen Verbindungen oder aus einem kompliziert zusammengesetzten Gemisch. Fraktioniertes Krystallisieren führt im Falle sehr kleiner Substanzmengen meist nicht zum Ziel, und es bietet oft keine Handhabe zur Überprüfung der Einheitlichkeit des Endpräparates.

Diese methodische Lücke wird von dem TSWETTschen Arbeitsgang auf das glücklichste ausgefüllt. Chromatographisch bereitete und in der Säule als homogen befundene Körper stehen zur Mikroanalyse bereit.

Selbstverständlich kann aber der *Versuchsmaßstab vergrößert* werden; schon jetzt arbeitet man in einzelnen Laboratorien, wenn nötig, mit mehreren Kilogrammen Adsorbens, in einem Ansatz. Auch der Einführung der TSWETTschen Methode in den Fabrikbetrieb steht in geeigneten Fällen nichts im Wege, so daß eine entsprechende Ausdehnung der Patentliteratur mit Bestimmtheit vorausgesagt werden darf.

Je verwickelter das Ausgangsmaterial, um so schwieriger ist seine Zerlegung, welche aber durch erneuerte, mit den einzelnen Fraktionen wiederholte Chromatographie verbessert und zu Ende geführt werden kann.

In der Laboratoriumspraxis wird ein präparatives Erfassen der homogenen Teillösungen manchmal unterbleiben müssen, nämlich z. B. dann, wenn die von der Natur dargebotene Substanz nicht einmal für eine Mikroanalyse hinreicht. Auch sonst begnügt man sich oft mit dem *Nachweis* und mit der *Bestimmung* des Stoffinhaltes, welcher in den Teileluaten vorliegt. Hierzu sind alle gebräuchlichen Verfahren brauchbar. Gerade darin besteht ja ein

Vorteil der hier behandelten Methodik, daß man, zumindest in einfacheren Fällen, fast ohne Verlust arbeitet und schließlich irgendwelche physikalischen oder chemischen Operationen vornehmen kann.

Handelt es sich um Farbstoffe, so liegen spektroskopische und colorimetrische Messungen an der Hand; bei schwach gefärbten oder farblosen Substanzen greift man zu anderen Methoden, unter Umständen auch zum Tierversuch.

e) Reinigung einer Substanz, z. B. eines technischen Produktes von Begleitern.

Zur Lösung derartiger Aufgaben genügt ein vereinfachter Versuchsgang, indem nur die Hauptzone bearbeitet wird, während man die sonstigen Säulenteile verwirft. War eine vollkommene Reinigung beabsichtigt, so ist die Adsorptionsanalyse bis zum vollständigen Verschwinden der Nebenzonen zu wiederholen. Selbst wenn die Säule nur so belanglose leere Zwischenräume aufweist, daß eine scharfe Abteilung durch Zerschneiden nicht möglich ist, verbessert man den Reinheitsgrad durch Wiederholung der Chromatographie in steigendem Maße, da die absolute Menge der Begleiter rasch abnimmt.

Besonders einfach gestaltet sich der Versuch, wenn aus einem, in seiner Hauptmenge farblosen Präparat ein Pigment auszuschalten ist, dessen Schicksal man mit dem Auge verfolgen kann, oder wenn die Adsorptionsaffinitäten von Haupt- und Nebenkomponente so stark voneinander abweichen, daß eine der beiden leicht durch die Kolonne läuft und quantitativ in das Filtrat gelangt.

Auch hier eröffnen sich gewisse technische Ausblicke, in engem Anschluß an bereits geübte Verfahren der fabrikatorischen Adsorptionsreinigung.

Beispiele S. 163.

f) Kennzeichnung und Kontrolle von Handelswaren.

Da einem käuflichen Produkt bestimmter Herkunft und Qualität (sofern es löslich oder extrahierbar ist) ein ganz bestimmtes Chromatogramm zukommt, bieten sich auch für die Warenkunde (u. a. für die praktische Pharmazie) vielfache Hilfsmittel. Hier

besteht die Aufgabe nicht darin, irgendwelche Trennungen vorzunehmen, sondern um die möglichst scharfe Kennzeichnung des Materials und eventuell um die Aufdeckung von Verfälschungen. Im Verlaufe solcher Adsorptionsanalysen wird man nicht selten auch die auf S. 71 erörterte Ultraviolettbelichtung der Säule vornehmen.

Als ein Ansatz in dieser Richtung erscheint die Arbeit von GRASSMANN sowie von GRASSMANN und LANG (S. 188). Die von ihnen bereiteten Chromatogramme waren in einigen Fällen zur raschen Unterscheidung von Gerbstoffen verschiedener Herkunft geeignet. Ferner sei die Aufmerksamkeit auf Angaben von RUGGLI und JENSEN (1, 2) gelenkt, betreffend Beurteilung gewisser Teerfarbstoffe (S. 152). Chromatographischer Nachweis von Verfälschungen des Weines: S. 148 (MOHLER und HÄMMERLE).

Zur Geschichte.

Als 1910 das zusammenfassende Werk von TSWETT (1), „Die Chromophylle in der Pflanzen- und Tierwelt", erschien, ist das 1906 eingeführte chromatographische Verfahren außerhalb seines Laboratoriums kaum angewandt worden. TSWETT zitiert lediglich Arbeiten von KRÄNZLIN sowie von STOKLASA, BRDLIK und ERNEST, welche teils polemischen Inhaltes sind. Wie bereits erwähnt, ist die ganze Entwicklung der neuen Methodik von dem Studium des Blattgrüns ausgegangen. TSWETT war von der Tragweite seiner Entdeckung und von der Zuverlässigkeit des Verfahrens so tief überzeugt, daß er — obwohl seine Versuche nicht bis zur Isolierung von Präparaten gediehen sind — trotz aller Angriffe daran festhielt, daß das Chlorophyll ein Gemisch zweier Komponenten ist, ebenso das damalige Phäophytin. Gleichfalls auf Grund chromatographischer Beobachtungen erklärt TSWETT, daß das sog. „krystallisierte Chlorophyll" kein Naturprodukt sein kann und aus zwei Bestandteilen bestehen muß. Er erkennt, daß der Unterschied zwischen krystallisiertem und amorphem Chlorophyll mit der Dualität des nativen Pigments nichts zu tun hat (TSWETT 1, 4, 8, 10, 13, 15, 16, 20, 21).

In den beiden nachfolgenden Jahrzehnten blieb die neue Versuchstechnik fast unbeachtet, wobei der Umstand mitspielt, daß das erwähnte TSWETTsche Buch nur in russischer Sprache ge-

druckt wurde. Man kann das von 1906 bis 1931 reichende Vierteljahrhundert als die *Latenzzeit* in der Geschichte der Chromatographie bezeichnen.

Einige, nachfolgend erwähnte, vereinzelt gebliebene Abhandlungen stammen aus dieser Frühperiode.

Wohl der erste Forscher, von dem die Bedeutung der TSWETTschen Methodik erkannt wurde, war DHÉRÉ, in dessen Laboratorium die adsorptionsanalytische Arbeitsweise seit 1911 in Gebrauch steht. Er ließ von seinen Schülern ROGOWSKI und VEGEZZI Experimentaluntersuchungen ausführen, u. a. über die Bestandteile des Blattgrüns, über Schneckenleberfarbstoffe, über das alte „Tetronerythrin" usw. Gleichzeitig wurden biochemisch wichtige Versuche von PALMER (meist mit ECKLES) mitgeteilt, betreffend die chromatographische Untersuchung des Milchfettpigments sowie anderer pflanzlichen und tierischen Produkte (1913—1914). Auch hat PALMER (1) in seiner, in englischer Sprache verfaßten Monographie nachdrücklich auf die TSWETTsche Idee hingewiesen (1922).

Etwas spätere Arbeiten stammen von COWARD (1924), ferner von LIPMAA (1926) und betreffen Blumenauszüge bzw. die Scheidung von Rhodoxanthin und Xanthophyll.

Die *Blütezeit* der Chromatographie datiert seit 1931 und ist vor allem durch die Übertragung der Versuche in den *präparativen Maßstab* gekennzeichnet.

TSWETT arbeitete mit kleinen Stoffmengen und pflegte die gelösten Farbstoffe nicht abzuscheiden. So kannte man ihre Krystallisierbarkeit kaum und sie gelangten auch nie zur chemischen Analyse. Deshalb blieb manche gute Beobachtung unbemerkt oder sie wurde stillschweigend angezweifelt. Daß aber bereits TSWETT (1) die präparative Anwendbarkeit der Chromatographie bewußt war, zeigt u. a. sein Versuch, in welchem die Isolierung von „Lecithin"-Krystallen aus frischem Eigelb durchgeführt wird.

Derartige, vereinzelte Beobachtungen sind indessen ohne allgemeineren Einfluß auf die chemische Arbeitsweise geblieben. Das TSWETTsche Verfahren gewann erst zu einem Zeitpunkt Aktualität, als aus den klassischen Enzymforschungen von WILLSTÄTTER und seiner Schule bereits bekanntgeworden war, daß man durch planmäßig geleitete Adsorptionen und Elutionen überraschend feine strukturelle Unterschiede präparativ erfassen kann.

Die Chromatographie wurde anfangs 1931 von KUHN und LEDERER, sowie von KUHN, WINTERSTEIN und LEDERER mit Erfolg in die präparative Chemie der *Polyenfarbstoffe* eingeführt. Die erstere Arbeit betrifft die Zerlegung des damals gerade 100 Jahre lang bekannt gewesenen Carotins in seine Komponenten, nebst Isolierung von α- und β-Carotin, während die letztgenannten Autoren aus verschiedenen Pflanzenteilen Lutein gewinnen und den Eidotterfarbstoff aufteilen konnten. So ging die 1910 gemachte Voraussage von TSWETT (1) in Erfüllung: „Sehr möglich, daß das Blattcarotin kein chemisches Individuum ist, sondern ein Gemisch von zwei oder von einigen Homologen, welche man mit Hilfe der Adsorptionsmethode voneinander scheiden könnte, unter Benutzung geeigneter Adsorbenten." — Noch Ende 1931 hat PETTER, wohl unabhängig von den erwähnten Forschern, die Aufteilung von Bacterio-ruberin vorgenommen, gleichfalls in präparativem Maßstab.

In den letzten Jahren verhalf die *präparativ* angewandte Chromatographie, namentlich in den Händen von KARRER sowie von KUHN, ferner von WINTERSTEIN u. a., vor allem die Chemie der *Carotinoide* zu einem neuen Aufschwung, so daß diese Methodik aus dem erwähnten Gebiet gar nicht mehr weggedacht werden kann. Die Versuche erstrecken sich nicht nur auf höhere Pflanzen, sondern auch auf Algen-, Pilz- und Bakterienfarbstoffe (CHARGAFF, HEILBRON, KARRER, LEDERER, WILLSTAEDT u. a.) sowie auf das tierische Lipochrom (BROCKMANN, v. EULER, HEILBRON, KARRER, KUHN, WILLSTAEDT, WINTERSTEIN, ZECHMEISTER und TUZSON usw.).

Es lag nahe, auch das wichtigste Pflanzenpigment, das Blattgrün, einer modernen Bearbeitung zu unterziehen. Die schon von TSWETT nachgewiesenen, aber erst von WILLSTÄTTER und STOLL isolierten und näher untersuchten Chlorophylle a und b wurden von WINTERSTEIN und STEIN (2, 3) in ausgezeichnetem Reinheitsgrad auf chromatographischem Wege bereitet. Betreffend Bakterienchlorophyll und seiner Abbauprodukte sei u. a. auf Forschungen von H. FISCHER hingewiesen. Daß auch das Gebiet der physiologisch wichtigen Flavine (KARRER, KOSCHARA, KUHN) sowie anderer *Naturfarbstoffe* entscheidende Förderung erhielt, wird noch später darzulegen sein. Die Aufteilung von wasserlöslichem Anthocyan ist kürzlich KARRER und STRONG gelungen.

Qualitative Versuche über *künstliche* Farbstoffpräparate stammen bereits von TSWETT (1); er hat aus petrolätherischer Lösung z. B. käufliches Fettblau und Sudan III in mehrere Zonen zerlegt. Wasserlösliche und sonstige Teerfarbstoffe wurden von RUGGLI und JENSEN (1, 2) verarbeitet.

Ein unerschöpfliches, methodisch eben erst erschlossenes Gebiet umfaßt die Untersuchung und Aufteilung von *farblosen Substanzen* in der Säule. Auch diesbezüglich findet man Tastversuche bei TSWETT (1), die aber nicht weit gediehen und in Vergessenheit geraten sind. Jüngst wurden in die moderne Arbeitstechnik verschiedene Kunstgriffe eingeführt, um die Schichtung sichtbar zu machen, damit der Gang des Versuches besser verfolgt und das Zerschneiden der Säule planmäßig vorgenommen werden könne. Naheliegend sind Farbreaktionen, die mit Filtraten, Eluaten, aber auch in der Kolonne selbst sich ausführen lassen. Ganz besonders entwicklungsfähig ist die Belichtung des Adsorptionsrohres mit der Quarzlampe, wodurch man oft in die Lage kommt, verschiedenartig *fluoreszierende Scheiben* zu unterscheiden („*Ultra*-chromatographie"). Diese Arbeitsweise wurde einerseits von WINTERSTEIN und SCHÖN (1), anderseits von KARRER und SCHÖPP (2) empfohlen (1933—1934).

Wasserlösliche Substanzen können chromatographisch und ultrachromatographisch bearbeitet werden, sie erfordern aber meist eine entsprechend umgestaltete Versuchsführung. Leitgedanken hierzu verdankt man KOSCHARA.

Es war im obigen nur beabsichtigt, die geschichtliche Entwicklung mit wenigen Zügen zu umreißen. Im Speziellen Teil findet man nähere Angaben über den derzeitigen Anwendungsbereich der Methode. Es wird von dort aus ersichtlich sein, daß das Adsorptionsverfahren ein unentbehrliches Hilfsmittel auch bei zahlreichen *Synthesen* geworden ist. Was ferner die *biochemisch und biologisch wichtigen Stoffe* betrifft, so werden die großen Fortschritte auf dem Vitamingebiet hervorzuheben sein. Bekanntlich hat KARRER (mit MORF und SCHÖPP) 1931—1933 reine A-Vitamin-Präparate chromatographisch gewonnen (s. auch die Forschungen von HEILBRON, HOLMES und ihrer Arbeitskreise). Das Vitamin D_3 wurde jüngst von WINDAUS, SCHENCK und WERDER als Kunstprodukt, von BROCKMANN (3) aus einem Leberöl mit chromatographischen Hilfsmitteln bereitet. Auf dem Gebiete der Enzyme,

Co-Fermente, biochemischen Aktivatoren usw. eröffnet sich für die Forscher ein breites Feld (vgl. EULER und ADLER; EULER und SCHLENK).

Vorgänge, die mit der in *einer* Richtung erfolgenden Durchströmung der TSWETTschen Kolonne vergleichbar sind und zu lokalen Stoffanreicherungen führen, dürften auch im *lebenden Gewebe* anzutreffen sein. Ferner können gewisse *geologische* Prozesse (nach TREIBS) von diesem Gesichtspunkte aus betrachtet werden.

Die recht zersplitterte *Literatur* nahm in den letzten Jahren einen bedeutenden Umfang an, was aus den, im Verzeichnis abgedruckten Zitaten am besten hervorgeht. Die erste moderne, ausführliche Zusammenfassung stammt von WINTERSTEIN (1); kürzere Sammelreferate wurden von ARMSTRONG, COOK, DAM, HESSE, LEDERER (1), SÖRENSEN (3), STIX, VALENTIN, WILLSTAEDT (1) sowie von den Verfassern (1) geliefert (s. auch ZECHMEISTER 1). Es ist erfreulich, daß die chromatographische Methode bereits Eingang in mehrere, für das Hochschulpraktikum bestimmte Lehrbücher gefunden hat (BERNHAUER; BERTHO und GRASSMANN; GATTERMANN und WIELAND).

Die theoretischen Grundlagen der Chromatographie wurden bereits von ihrem Entdecker erkannt. Es handelt sich offenbar um eine *Auswahl, auf Grund der verschieden stark wirksamen Adsorptionsaffinitäten mehrerer Stoffe, in gemeinsamer Lösung, gegenüber dem gleichen Adsorbens.* Die einzelnen Komponenten schichten sich dann in der sinkenden Reihenfolge ihrer, auf die Oberflächenspannung ausgeübten, vermindernden Wirkung. Über die bei der üblichen chromatographischen Arbeitsweise sich abspielenden Teilvorgänge sei zusammenfassend folgendes ausgeführt, zumeist in Anlehnung an die Gedankengänge von TSWETT (1). Wir verfolgen der Einfachheit halber das Schicksal eines *Farbstoffgemisches* und möchten betonen, daß die Chromatographie farbloser Substanzen grundsätzlich ebenso verläuft.

Betrachtet man die gesamte Aufnahmefähigkeit einer gegebenen Adsorbensmenge als konstant, so werden sich um diese Oberflächenkräfte alle in der Lösung vorliegenden Substanzen gleichzeitig, jedoch mit ganz verschiedenem Enderfolg bewerben. Reicht die Masse des Adsorptionsmittels zur Bindung des gesamten Pigments nicht aus, so wird nur die mit der *stärksten Affini-*

tät ausgestattete Farbstoffart festgehalten und hierdurch die adsorbierende Oberfläche „erschöpft“.

Dies ist in der Tat der Fall, wenn die auf die Säule gegossene Lösung zunächst mit der obersten, hinreichend dünn gedachten Scheibe in Berührung kommt. Durch das Passieren der letzteren ist also die Lösung nur in bezug auf ihren best-adsorbierbaren Inhaltsstoff verdünnter geworden. Ansonsten blieb sie unverändert und tritt nun in die nächst-tiefer liegenden Bezirke ein, wo der Restbetrag der erwähnten Substanz allmählich erschöpft und festgehalten wird. Sofort übernimmt ihre Rolle eine andere Verbindung, welche in bezug auf die Adsorbierbarkeit an die erste Stelle vorgerückt ist und an der die stetig weiter sickernde Flüssigkeit bald ebenfalls verarmt, nachdem auch dieser zweite Farbstoff, unterhalb des ersteren, sich in der Säule abgelagert hat. So läuft das Spiel weiter, bis die Lösung praktisch farblos geworden ist und bis man schließlich, in der von oben nach unten geltenden Reihenfolge der ausgebildeten Farbzonen, ein Schema der *Adsorptionsrangordnung* erblickt, welche alle Komponenten der Rohlösung umfaßt.

Die gegebene Beschreibung der bei dem Zustandekommen des Chromatogramms verlaufenden Vorgänge ist indessen nur in groben Zügen zufriedenstellend, und sie harrt noch der Ergänzung in bezug auf feinere Teilprozesse. Denn offenbar trifft die Annahme nicht streng zu, daß die Oberfläche jedes einzelnen Körnchens von vornherein und ausschließlich die mit der größten Affinität ausgestattete Komponente binde. Vielmehr werden auch Bruchteile des übrigen Farbstoffinhaltes in der Elementarschicht hängen bleiben; sie werden jedoch von der stetig nachfolgenden „stärksten“ Komponente aus ihrer Adsorptionsverbindung *verdrängt*: sie verlassen die feste Phase und gelangen wieder in Lösung. Nach der Freilegung werden sie von dem Flüssigkeitsstrom in den nächst-tiefer liegenden Bezirk mitgerissen, wo sie, vorübergehend fixiert, wiederum eine Verdrängung erleiden. Dieser Anteil lagert sich endgültig erst ab, wenn nichts „Stärkeres“ mehr nachkommt, wenn also der Farbring des Verdrängers in einem höher liegenden Säulenteil bereits fertig ausgebildet ist.

Die experimentellen Stützen dieser Anschauung reichen bis zu TSWETT zurück. Auch wir hatten wiederholt Gelegenheit, diese eigenartigen Verhältnisse zu beobachten. So wurde z. B. die Lö-

sung eines homogenen, gelben Polyenfarbstoffes in die Säule geführt, welcher in der Nähe des oberen Randes hängen blieb. Nachdem das Chromatogramm sich stabil ausgebildet hatte, haben wir die Lösung einer zweiten, und zwar stärker adsorbierbaren, roten Verbindung aufgegossen, mit dem Ergebnis, daß der früher erhaltene Farbring alsbald nach unten wanderte und seinen Platz an das zweite Pigment abtrat (Abb. 31—32, S. 192). Wiederholt man jedoch den Versuch in der umgekehrten Reihenfolge der Farbstoffe, so findet eine derartige Verdrängung nicht statt: Die Lösung des später eingeführten (schwächer adsorbierbaren) gelben Farbstoffes passiert jetzt den bereits fixierten roten Bezirk, um eine tiefer liegende Stelle zu belegen. In beiden Fällen erhält man schließlich das nämliche Chromatogramm. Ähnliche Erfahrungen haben RUGGLI und JENSEN (1, dort S. 636) an Azofarbstoffen gemacht.

Unter sonst gleichbleibenden Versuchsbedingungen ist also nur die *Reihenfolge* der einzelnen Körper gegeben, während der in dem Adsorbens absolut eingenommene *Platz jedes Farbstoffes von der Art der übrigen abhängt.*

Interessant sind auch die Vorgänge, die sich beim „*Entwickeln*" des Chromatogramms abspielen. Saugt man reines Lösungsmittel nach, so wird (den einzelnen Adsorptionskoeffizienten entsprechend) Farbstoff herausgelöst; die Verteilung zwischen den beiden Phasen steuert in der Elementarschicht dem betreffenden Adsorptionsgleichgewicht zu. Ist dasselbe erreicht worden, so verläßt die Lösung, in bezug auf die Konzentration an dem betreffenden Farbstoff, unverändert die Elementarzone. Sobald sie jedoch auf pigment-freie Bezirke stößt, setzt von neuem Adsorption ein und nun läßt sich der Farbstoffinhalt von einer Reihe dünngedachter Scheiben schließlich vollständig abfangen. Die Flüssigkeit fließt also farblos weiter, nachdem ihr Pigmentgehalt, im Verlaufe der erwähnten Vorgänge, allmählich von Null bis zu einem Grenzwert angestiegen ist, um wieder auf Null zu fallen (TSWETT).

Solche Vorgänge spielen sich an zahllosen Stellen der Adsorptionssäule gleichzeitig ab. Jede Volumeinheit der Waschflüssigkeit löst Bruchteile des Farbstoffes heraus und transportiert sie nach einem tiefer liegenden Bezirk der Kolonne. Das Integral aller Teilprozesse kommt in einem langsamen *Abwärtswandern* sämtlicher Pigmentkomponenten zur Geltung. Es ist klar, daß

die Wanderung der einzelnen Zonen, schon mit Rücksicht auf die Verschiedenheit der Adsorptionskoeffizienten, mit ungleichen Geschwindigkeiten einsetzen und verlaufen wird. Im allgemeinen werden die am schwächsten adsorbierten und leichtest eluierbaren Komponenten am raschesten nach unten geführt. Da aber gerade solche Farbstoffe schon von Haus aus die untersten Abschnitte des rohen Chromatogramms gebildet haben, müssen sich die weißen *Zwischenräume* während des Entwickelns *vergrößern* oder sie zeigen sich überhaupt erst jetzt (Abb. 33, 34, 35, S. 193). Das Chromatogramm dehnt sich aus; die Einzelschichten werden schärfer ausgeprägt, sehr zum Vorteil des Experimentators, der nun die aus dem Rohr gedrückte Säule zu *zerschneiden* hat.

Über die darauffolgende *Elution* der individuellen Farbstoffe aus den Säulenteilen sei folgendes bemerkt. Das geeignete Mittel hierzu ist empirisch zu wählen. Hat man im Hauptversuch z. B. Schwefelkohlenstoff, Benzin, Petroläther, Tetrachlormethan angewandt, so bewirkt nach TSWETT meist schon der Zusatz von etwas Sprit sofortige Elution. Man erwarte natürlich nicht, daß eine Verbindung aus dem Medium, in welchem sie schwer löslich ist, leicht adsorbiert werde, während gute Solventen zur Elution geeignet seien. Oft zeigt sich gerade das Gegenteil; z. B. läßt sich das Carotin aus Benzin sehr gut chromatographisch festhalten und mit Hilfe von Alkohol eluieren, obzwar es im ersteren Solvent verhältnismäßig reichlich, in dem letzteren so gut wie gar nicht löslich ist. Hier handelt es sich eben nicht um einfache Lösungsvorgänge, sondern um die Zerlegung von Adsorbaten, wobei die Verhältnisse betreffend Oberflächenspannung und auch chemische Faktoren mitwirken.

Ausblicke. Wenn auch die in der Kolonne sich abspielenden Vorgänge, was ihr Wesen anbelangt, verständlich sind, so wäre ein weiteres Eindringen in die Probleme des behandelten Gedankenkreises erwünscht, im Anschluß an die bekannte physikalisch-chemische Theorie der Adsorptionen.

Es könnten Zusammenhänge zwischen dem Verhalten eines Stoffes in der TSWETTschen Säule und seiner physikalischen Konstanten ermittelt werden, z. B. der Viskosität der Lösung, welche im Verlaufe des Versuches zunächst ständig abnimmt. Auch müssen zu den *Diffusionsgeschwindigkeiten* und ferner zum *Färbevermögen* auf Faserstoffen Beziehungen bestehen. Die letzteren Probleme

wurden von RUGGLI und JENSEN (1) angeschnitten. Es hat sich in mehreren, aber nicht in allen untersuchten Fällen gezeigt, daß Teerfarbstoffe, die in Gelatine langsamer diffundieren, mittels Aluminiumoxyds leichter festzuhalten sind. Eine allgemeiner verwertbare Regelmäßigkeit erblickt man noch nicht.

Es fehlt eben an einer gut ausgearbeiteten theoretischen Grundlage, welche auch für den Spezialfall der TSWETTschen Anordnung nur im Rahmen der *Elektronentheorie* geschaffen werden könnte. Die Bedingungen zur stabilen Festhaltung in der Säule hängen auch hier u. a. von dem Molekülfeinbau des Lösungsmittels ab; z. B. wird das Vitamin A aus dem homäopolaren Cyclohexan viel leichter aufgenommen als aus dem heteropolaren Chloroform (BOWDEN und BASTOW).

Besonders dankbare Probleme bieten sich auf dem Gebiete der Elutions- und namentlich der *Verdrängungsvorgänge*, wenn jene auch keineswegs leicht vorauszusehen sind. Es handelt sich, sogar im einfachsten Falle, um die Wechselwirkung von Adsorbens, Lösungsmittel und zweier gelösten organischen Verbindungen. Daß nicht nur die Geschwindigkeit eines Verdrängungsvorganges von der Beschaffenheit der festen Phase abhängig ist, sondern auch dessen Richtung, geht z. B. aus der (keineswegs alleinstehenden) Angabe hervor, daß die Kalksäule oben das Follikulin und in einem tiefer liegenden Bezirk das Indirubin festhält, während auf Tonerde eine umgekehrte Schichtenfolge beobachtet wurde (DUSCHINSKY und LEDERER). Das theoretische Studium verwickelterer Vorgänge, das „Vielkörper-Problem" der Chromatographie, erscheint ebenfalls als zeitgemäß.

Eine andere Art von Verdrängung stellt sich ein, wenn gleichzeitig mit der Adsorption gewisse Atomgruppen aus der festen Phase entfernt werden, um dem aufzunehmenden Stoff Platz zu machen. Ein schönes Beispiel hierfür wurde von KOLTHOFF, V. FISCHER und ROSENBLUM (s. auch KOLTHOFF und ROSENBLUM) am Bleisulfat studiert. Bindet dieses Adsorbens den Triphenylmethanfarbstoff Wollviolett 4BN, so werden an der Oberfläche der festen Phase Sulfationen durch Farbstoffionen *ausgetauscht*:

$$\underset{\text{(Oberfläche)}}{PbSO_4} + \underset{\text{(Lösung)}}{\text{Wollviolett}} \longrightarrow \underset{\text{(Oberfläche)}}{\text{Pb Wollviolett}} + \underset{\text{(Lösung)}}{SO_4^{--}}$$

Die ersteren gelangen in die Lösung, wo auch Natriumionen aus

dem Farbstoff verblieben sind. Die Verwertung solcher Beobachtungen bei der Chromatographie wäre erwünscht.

C_2H_5
$-N-CH_2-$ $-SO_3Na$
$C_2H_5 . N-$ $-C$
$=N(C_2H_5)_2$
CH_2
OH
SO_3Na

Wollviolett 4 BN.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die physikalisch-chemische Untersuchung von Teilvorgängen, die speziell in der TSWETTschen Säule verlaufen, noch ausbaufähig ist.

Zusammenhang zwischen Chromatogramm und Konstitution.

Es befriedigt nicht, wenn man das Verhalten zahlreicher Verbindungen in der TSWETTschen Säule empirisch festlegt, sondern es müssen die Beziehungen zum molekularen Bau näher erforscht werden. Diese Arbeit ist noch wenig fortgeschritten, sie liefert jedoch bereits einige Stützen für den Experimentator, nämlich die Voraussage des Adsorptionsverhaltens für bestimmte Fälle sowie auch Rückschlüsse auf die Strukturformel, auf Grund eines chromatographischen Versuches.

Es wird noch systematisch zu prüfen sein, wie feine Unterschiede für die Trennung von zwei Substanzen hinreichen, inwiefern z. B. Stereoisomere im Chromatogramm auseinandergehalten werden. Es sei in diesem Zusammenhang die gelungene Fraktionierung von cis- und trans-Bixin, ferner von cis- und trans-Crocetin-dimethylester erwähnt (WINTERSTEIN und STEIN 1, WINTERSTEIN 1).

Nachstehend werden über den Einfluß von gewissen Atomgruppen auf die Stärke der Adsorptionsaffinität Angaben gemacht, so weit dies schon heute tunlich ist.

1. Synthetische Polyene.

Die *Poly-ene* enthalten ein mehr oder minder langes System von lückenlos konjugierten C-Doppelbindungen in offener Kette. Die Vertreter dieser Reihe sind streng analog gebaut, so daß es leicht ist, dasjenige Strukturelement herauszufinden, durch welches die Adsorbierbarkeit spezifisch gesteigert wird. Es ist dies die *Äthylenbindung*. Je länger die erwähnte ungesättigte Gruppierung sich ausdehnt, um so stärker gibt sich die Adsorptionsaffinität kund, was theoretisch einleuchtend ist. Das Beispiel der von KUHN und WINTERSTEIN (5) dargestellten *Diphenyl-polyene*, mit der allgemeinen Formel

$$C_6H_5—(CH=CH)_n—C_6H_5$$

zeigt nach WINTERSTEIN und SCHÖN (2) den Einfluß, den der Mehrgehalt an einer einzigen Doppelbindung auf das Verhalten in der Adsorptionssäule ausübt (Tabelle 1):

Tabelle 1. Adsorptionsrangordnung der Diphenyl-polyene.

Stärkste Ads.	$C_6H_5—CH=CH—CH=CH—CH=CH—CH=CH—C_6H_5$ Diphenyl-octatetraen.
	$C_6H_5—CH=CH—CH=CH—CH=CH—C_6H_5$ Diphenyl-hexatrien.
	$C_6H_5—CH=CH—CH=CH—C_6H_5$ Diphenyl-butadien.
	$C_6H_5—CH=CH—C_6H_5$ Stilben.
schwächste Ads.	$C_6H_5—C_6H_5$ Diphenyl.

Nach der Entwicklung nehmen die genannten Homologen scharf geschiedene Plätze im Chromatogramm ein, was besonders schön im ultravioletten Licht sich vorführen läßt: oben erblickt man zwei verschieden gelb aufleuchtende, darunter in drei verschiedenen Blau fluoreszierende Zonen.

Wird der Benzolring durch gewisse *heterocyclische* Gebilde ersetzt, so bleibt der adsorptionssteigernde Einfluß der konjugierten Doppelbindungen bestehen. Nach RUGGLI und JENSEN (1) enthält das aus wäßriger Lösung bereitete Al_2O_3-Chromatogramm, im

Rahmen der von KUHN, WINTERSTEIN und BALSER studierten (teils unveröffentlichten) *Indolenin-Reihe*, den blauen Farbstoff oben, den gelben im untersten Bezirk. Auch hier laufen also Farbtiefe und Adsorptionsaffinität parallel (Tabelle 2):

Tabelle 2. Adsorptionsrangordnung einiger Indoleninfarbstoffe.

Stärkste Ads.

CH_3 CH_3 CH_3 CH_3

C C

C=CH—CH=CH—CH=CH—CH=CH—C

N N

CH_3 Cl CH_3

Indolenin-blau.

CH_3 CH_3 CH_3 CH_3

C C

C=CH—CH=CH—CH=CH—C

N N

CH_3 Cl CH_3

Indolenin-violett.

CH_3 CH_3 CH_3 CH_3

C C

C=CH—CH=CH—C

N N

CH_3 Cl CH_3

Indolenin-rot (Astraphloxin).

CH_3 CH_3 CH_3 CH_3

C C

C=CH—C

N N

CH_3 Cl CH_3

schwächste Ads.

Indolenin-gelb.

2. Natürliche Polyene: Carotinoide.

Wie bekannt, sind die Carotinoide fettlösliche, wasserunlösliche, gelbe bis violette Farbstoffe, welche sich von dehydrierten Isoprenresten ableiten. Ihr ganz oder vorwiegend aliphatischer Charakter kommt in den S. 25—27 stehenden Symbolen zum Ausdruck (0, 1 oder 2 Jononringe). Von den oben besprochenen synthetischen Polyenen unterscheiden sich die Carotinoide am auffallendsten durch die mehrfache Verzweigung des Kohlenstoffskelettes (Näheres in der Monographie von ZECHMEISTER 1).

Die Carotinoide im engeren Sinne (mit C_{40}) bieten ein geeignetes Material für die angedeutete Untersuchung, betreffend Adsorptionsverhalten und Struktur. Die allgemeine Gestalt des Moleküls ist bei sämtlichen Vertretern dieser Pigmentklasse übereinstimmend, ebenso die Lage und Bindungsart der 22 mittleren Kohlenstoffatome. Auf Grund der Strukturformeln lassen sich die folgenden *Regeln* ableiten (Tabelle 3—6, S. 23—27). *Bei sonst analogem molekularen Bau ist die Adsorptionsaffinität stärker, also die in der Säule relativ eingenommene Stelle höher liegend:*

1. wenn die Anzahl der Doppelbindungen größer ist (Beispiel: Lycopin und γ-Carotin),
2. wenn bei gleicher Anzahl solcher Bindungen alle konjugiert sind (Beispiel: β- und α-Carotin),
3. wenn im Falle identischer ungesättigter Systeme Hydroxyl im Molekül vorkommt (Beispiel: Kryptoxanthin und β-Carotin),
4. wenn die Anzahl der OH-Gruppen steigt (Beispiel: Zeaxanthin und Kryptoxanthin) und
5. wenn an Stelle einer C-Doppelbindung konjugiertes Carbonyl steht (Beispiel: Capsanthin und Zeaxanthin).

Ähnliches gilt nicht nur für die nativen Carotinoide, sondern auch für deren künstliche *Abbauprodukte*, z. B. Carotinon und Semi-β-carotinon (KUHN und BROCKMANN 6, 10: Tabelle 7, S. 28). Über die Beziehung zwischen *Farbe* und Adsorptionsverhalten s. S. 21, 30 und 92.

Die Haftfestigkeit eines Polyens an der adsorbierenden Oberfläche geht also mit der Größe derjenigen Kräfte parallel, die in der älteren Chemie unter dem Begriff „Partialaffinität" zusammengefaßt wurden. Dazu kommt noch die spezifische Wirkung des *Hydroxyls*, welche z. B. auf $CaCO_3$, $Ca(OH)_2$ oder Al_2O_3 viel stärker und wohl in „chemischem" Sinne zum Ausdruck kommt als der Mehrgehalt an 1 konjugierten Doppelbindung. So nimmt das

Lutein (mit nur 10 konj. F) einen höheren Platz in der Säule ein als das Lycoxanthin (11 konj. F), wobei die größere Anzahl der *Hydroxyle* (2 gegen 1) entscheidend ist (Tabelle 6, S. 26). Als merkwürdig erscheint dort auch die Einordnung des Rhodoxanthins. Dieses Keton (12 konj. F, daran anschließend 2 Carbonyle, kein Hydroxyl) steht tiefer als die Polyenalkohole mit nur 11 C-Doppelbindungen. Auch hier denkt man wohl an einen besonders starken Anschluß des Hydroxyls an das Adsorptionsmittel.

Wird die OH-Gruppe *verestert*, so sinkt die Adsorptionsaffinität des Carotinoids in außerordentlichem Maße, so daß das Verhalten an sauerstoff-freie Polyene erinnert. In der Rangordnung steht Zeaxanthin-dipalmitat (Physalien) nicht nur tiefer als Zeaxanthin, sondern seine Adsorbierbarkeit wird sogar von dem Kryptoxanthin übertroffen. 1 unverestertes Hydroxyl ist also weit stärker wirksam als mehrere veresterte. Ferner kommt die größere Länge des konjugierten Systems auch beim Rhodoxanthin sofort zur Geltung, wenn es z. B. mit freiem und mit verestertem Zeaxanthin verglichen wird: in der Säule nimmt das Keton eine Mittelstellung ein.

Was speziell die *Ester* anbetrifft, so wird ihr chromatographisches Verhalten auch von der Art der sauren Komponente mitbestimmt, namentlich wenn die letztere ungesättigter Natur ist.

Die erste *Adsorptions-Rangordnung* auf dem Gebiete der Carotinoide stammt von WINTERSTEIN (1) und ist in der Tabelle 3 wiedergegeben:

Tabelle 3. Adsorptionsreihe der wichtigsten Carotinoide aus Benzinlösung, nach WINTERSTEIN (1).

Am stärksten adsorbiert	Fucoxanthin	$C_{40}H_{56}O_6$		
	Violaxanthin	$C_{40}H_{56}O_4$		
Abnahme der Adsorptionsaffinität ↓	Taraxanthin	$C_{40}H_{56}O_4$		
	Flavoxanthin	$C_{40}H_{56}O_3$	Alkohole	$CaCO_3$ (Adsorptionsmittel)
	Zeaxanthin	$C_{40}H_{56}O_2$		
	Lutein	$C_{40}H_{56}O_2$		
	Rhodoxanthin	$C_{40}H_{50}O_2$	Keton	
	Physalien	$C_{72}H_{116}O_4$	Ester	
	Helenien	$C_{72}H_{116}O_4$	„	
	Lycopin	$C_{40}H_{56}$		
	γ-Carotin	$C_{40}H_{56}$	Kohlenwasserstoffe	Al_2O_3 (Adsorptionsmittel)
am schwächsten adsorbiert	β-Carotin	$C_{40}H_{56}$		
	α-Carotin	$C_{40}H_{56}$		

Reiht man auch einige neuentdeckte Vertreter ein, so ergibt sich für die unveresterten, sauerstoffhaltigen Carotinoide der Reihe C_{40} etwa die in der Tabelle 4 verzeichnete Schichtenfolge[1]:

Tabelle 4. Adsorptionsrangordnung von sauerstoffhaltigen Carotinoiden (unverestert).

Am stärksten adsorbiert	Fucoxanthin . .	$C_{40}H_{56}O_6$	(Struktur unbekannt)
	Capsorubin. . .	$C_{40}H_{60}O_4$	(Dioxy-diketon)
	Capsanthin. . .	$C_{40}H_{58}O_3$	(Dioxy-monoketon)
	Violaxanthin . .	$C_{40}H_{56}O_4$	(3—4-wertige Alkohole)
	Taraxanthin . .	$C_{40}H_{56}O_4$	
	Antheraxanthin	$C_{40}H_{56}O_3$	(3-wertige Alkohole)
	Petaloxanthin .	$C_{40}H_{56}O_3$	
	Flavoxanthin. .	$C_{40}H_{56}O_3$	
	Lycophyll . . .	$C_{40}H_{56}O_2$	(2-wertige Alkohole)
	Zeaxanthin. . .	$C_{40}H_{56}O_2$	
	Lutein.	$C_{40}H_{56}O_2$	
	Lycoxanthin . .	$C_{40}H_{56}O$	(1-wertige Alkohole)
am schwächsten	Krypto- und Rubixanthin .	$C_{40}H_{56}O$	
adsorbiert	Rhodoxanthin .	$C_{40}H_{50}O_2$	(Diketon)

Die Tabellen 5 und 6 enthalten strukturell geklärte Carotinoide und geben gleichzeitig deren Rangordnung.

Ähnlich liegen die Adsorptionsverhältnisse bei gewissen künstlichen Abbauprodukten der Carotinoide (vgl. Tabelle 7, S. 28).

3. Mehrkernige aromatische Kohlenwasserstoffe mit kondensierten Ringen.

Es haben sich auch auf diesem Gebiete interessante Beziehungen zwischen Molekülbau und Adsorptionsrangordnung ergeben, welche auf Grund der Arbeiten von WINTERSTEIN und SCHÖN (2, 3), ferner von WINTERSTEIN, SCHÖN und VETTER, von WINTERSTEIN und VETTER sowie von WINTERSTEIN, VETTER und SCHÖN folgend skizziert werden können.

Oft zeigt sich auch hier die Regelmäßigkeit, daß der in der

[1] Nachstehende Kombinationen sind auf Grund der Literatur bearbeitet worden und konnten nicht unmittelbar in der Säule verglichen werden: Fucoxanthin—Capsorubin, Lycophyll—Flavoxanthin, Antheraxanthin (und Petaloxanthin)—Flavoxanthin. Dieselben—Lycophyll.

Tabelle 5. Adsorptionsrangordnung der natürlichen Polyen-kohlenwasserstoffe, in Abhängigkeit von dem Molekülbau.

Adsorptionsaffinität sinkt

```
CH3 CH3                                                                                                              CH3 CH3
   \/                                                                                                                   \/
   C                                                                                                                    C
   ‖                                                                                                                     \\
CH  CH—CH=CH—C=CH—CH=CH—C=CH—CH=CH—CH=C—CH=CH—CH=C—CH=CH—CH  CH
|   |          |          |                 |              |        ‖   |
CH2 C—CH3     CH3        CH3               CH3            CH3  CH3—C   CH2
  \/                                                                  \/
  CH2                                                                 CH2
```

Oben: Lycopin (11 konjugierte + 2 isolierte F).

```
CH3 CH3                                                                                                              CH3 CH3
   \/                                                                                                                   \/
   C                                                                                                                    C
  / \                                                                                                                    \\
CH2 C—CH=CH—C=CH—CH=CH—C=CH—CH=CH—CH=C—CH=CH—CH=C—CH=CH—CH  CH
|   ‖          |          |                 |              |        ‖   |
CH2 C—CH3     CH3        CH3               CH3            CH3  CH3—C   CH2
  \/                                                                  \/
  CH2                                                                 CH2
```

γ-Carotin (11 konjugierte + 1 isolierte F).

```
CH3 CH3                                                                                                              CH3 CH3
   \/                                                                                                                   \/
   C                                                                                                                    C
  / \                                                                                                                  / \
CH2 C—CH=CH—C=CH—CH=CH—C=CH—CH=CH—CH=C—CH=CH—CH=C—CH=CH—C   CH2
|   ‖          |          |                 |              |        ‖   |
CH2 C—CH3     CH3        CH3               CH3            CH3  CH3—C   CH2
  \/                                                                  \/
  CH2                                                                 CH2
```

β-Carotin (11 konjugierte + 0 isolierte F).

```
CH3 CH3                                                                                                              CH3 CH3
   \/                                                                                                                   \/
   C                                                                                                                    C
  / \                                                                                                                  / \
CH2 C—CH=CH—C=CH—CH=CH—C=CH—CH=CH—CH=C—CH=CH—CH=C—CH=CH—CH  CH2
|   ‖          |          |                 |              |        |   |
CH2 C—CH3     CH3        CH3               CH3            CH3  CH3—C   CH2
  \/                                                                  \\
  CH2                                                                 CH
```

Unten: α-Carotin (10 konjugierte + 1 isolierte F).

Tabelle 6. Adsorptionsrangordnung von sauerstoffhaltigen Carotinoiden, in Abhängigkeit von dem Molekülbau.

Adsorptionsaffinität sinkt

```
 CH3 CH3                                                                                                         CH3 CH3
    C                                                                                                                C
CH2 O=C—CH=CH—C=CH—CH=CH—C=CH—CH=CH—CH=C—CH=CH—CH=C—CH=CH—C=O CH2
HOCH    CH2—CH3   CH3        CH3              CH3             CH3   CH3—CH2 CHOH
 CH2                                                                                                                CH2
```

Oben: Capsorubin (9 C-Doppelbindungen, konjugiert mit 2 Carbonylen = 12 konjugierte „Doppelbindungen“[1]; 2 Hydroxyle).
(Struktur der Molekülenden in Einzelheiten unsicher.)

```
 CH3 CH3                                                                                                         CH3 CH3
    C                                                                                                                C
CH2 C—CH=CH—C=CH—CH=CH—C=CH—CH=CH—CH=C—CH=CH—CH=C—CH=CH—C=O CH2
HOCH C—CH3    CH3        CH3              CH3             CH3   CH3—CH2 CHOH
 CH2                                                                                                                CH2
```

Capsanthin (10 C-Doppelbindungen, konjugiert mit 1 Carbonyl = 11,5 konjugierte „Doppelbindungen“; 2 Hydroxyle).
(Struktur des rechten Molekülendes unsicher.)

```
 CH3 CH3                                                                                                         CH3 CH3
    C                                                                                                                C
CH  CH—CH=CH—C=CH—CH=CH—C=CH—CH=CH—CH=C—CH=CH—CH=C—CH=CH—CH CH
HOCH C—CH3    CH3        CH3              CH3             CH3   CH3—C   CHOH
 CH2                                                                                                                CH2
```

Lycophyll (11 konjugierte + 2 isolierte C-Doppelbindungen; 2 Hydroxyle).

```
 CH3 CH3                                                                                                         CH3 CH3
    C                                                                                                                C
CH2 C—CH=CH—C=CH—CH=CH—C=CH—CH=CH—CH=C—CH=CH—CH=C—CH=CH—C   CH2
HOCH C—CH3    CH3        CH3              CH3             CH3   CH3—C   CHOH
 CH2                                                                                                                CH2
```

Zeaxanthin (11 konjugierte C-Doppelbindungen; 2 Hydroxyle).

---

[1] 1 Carboxyl oder Carbonyl, welches mit dem ungesättigten System in lückenloser Konjugation steht, wirkt sich bei der Farbbildung (nach KUHN und WINTERSTEIN 6) so aus wie $1^1/_2$ C-„Doppelbindungen“. Auch in bezug auf die Adsorptionsaffinität darf dies schematisch gesetzt werden.

Adsorptionsaffinität sinkt

```
  CH3 CH3                                                                                              CH3 CH3
    \ /                                                                                                  \ /
     C                                                                                                    C
    / \                                                                                                  / \
 CH2   C—CH=CH—C=CH—CH=CH—C=CH—CH=CH—CH=C—CH=CH—CH=C—CH=CH—CH   CH2
  |    |       |              |                   |              |        |     |
HOCH   C—CH3  CH3            CH3                 CH3            CH3  CH3—C   CHOH
    \ /                                                                    \\ /
    CH2                                                                     CH
```

Lutein (Xanthophyll) (10 konjugierte + 1 isolierte C-Doppelbindungen; 2 Hydroxyle).

```
  CH3 CH3                                                                                              CH3 CH3
    \ /                                                                                                  \ /
     C                                                                                                    C
    //                                                                                                     \\
  CH   CH—CH=CH—C=CH—CH=CH—C=CH—CH=CH—CH=C—CH=CH—CH=C—CH=CH—CH   CH
  |    |        |             |                   |              |        |     |
HOCH   C—CH3   CH3           CH3                 CH3            CH3  CH3—C   CH2
    \ /                                                                    \ /
    CH2                                                                    CH2
```

Lycoxanthin (11 konjugierte + 2 isolierte C-Doppelbindungen; 1 Hydroxyl).

```
  CH3 CH3                                                                                              CH3 CH3
    \ /                                                                                                  \ /
     C                                                                                                    C
    / \                                                                                                  / \
 CH2   C—CH=CH—C=CH—CH=CH—C=CH—CH=CH—CH=C—CH=CH—CH=C—CH=CH—C   CH2
  |    |       |              |                   |              |        ||    |
HOCH   C—CH3  CH3            CH3                 CH3            CH3  CH3—C   CH2
    \ /                                                                    \ /
    CH2                                                                    CH2
```

Kryptoxanthin (11 konjugierte C-Doppelbindungen; 1 Hydroxyl).

```
  CH3 CH3                                                                                              CH3 CH3
    \ /                                                                                                  \ /
     C                                                                                                    C
    / \                                                                                                  / \
 CH2   C=CH—CH=C—CH=CH—CH=C—CH=CH—CH=CH—C=CH—CH=CH—C=CH—CH=C   CH2
  |    |       |              |                   |              |        |     |
 O=C   C—CH3  CH3            CH3                 CH3            CH3  CH3—C   C=O
    \ //                                                                   \\ /
     CH                                                                     CH
```

Unten: Rhodoxanthin (12 C-Doppelbindungen, konjugiert mit 2 Carbonylen = 15 „Doppelbindungen"; kein Hydroxyl).

Tabelle 7. Adsorptionsrangordnung von Oxydationsprodukten des β-Carotins.

```
CH3   CH3                                                                                                      CH3   CH3
   \ /                                                                                                            \ /
    C                                                                                                              C
   / \                                                                                                            / \
CH2  O=C—CH=CH—C=CH—CH=CH—C=CH—CH=CH—CH=C—CH=CH—CH=C—CH=CH—C=O  CH2
 |                |              |                       |               |                 |
CH2    C—CH3    CH3            CH3                     CH3             CH3     CH3—C        CH2
   \  /   ||                                                                       ‖   \   /
   CH2    O                                                                         O   CH2
```

Oben: β-Carotinon.

```
CH3 CH3                                                                                                   CH3 CH3
   \ /                                                                                                       \ /
    C                                                                                                   HO    C
   / \                                                                                                    \  / \
CH2   C—CH=CH—C=CH—CH=CH—C=CH—CH=CH—CH=C—CH=CH—CH=C—CH=CH—C     CH2
 |    ‖            |              |                       |               |             |      |
CH2   C—CH3      CH3            CH3                     CH3             CH3     CH3—C      CH2
   \ /                                                                                   / \   /
   CH2                                                                                 OH   CH2
```

β-Oxy-carotin.

```
CH3 CH3                                                                                                  CH3 CH3
   \ /                                                                                                      \ /
    C                                                                                                        C
   / \                                                                                                      / \
CH2  C—CH=CH—C=CH—CH=CH—C=CH—CH=CH—CH=C—CH=CH—CH=C—CH=CH—C=O  CH2
 |   ‖           |              |                       |               |                   |
CH2  C—CH3     CH3            CH3                     CH3             CH3     CH3—C          CH2
   \ /                                                                                   \    /
   CH2                                                                                O   CH2
```

Unten: Semi-β-carotinon.

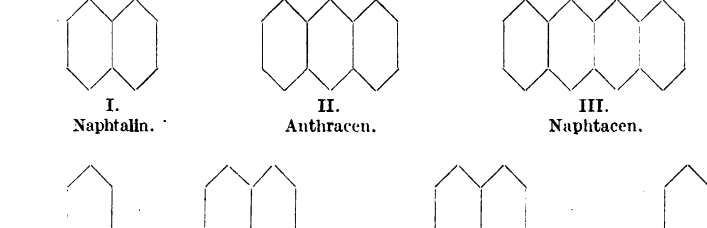
Adsorptionsaffinität sinkt

Säule (relativ) eingenommene Platz um so höher liegt, je *mehr Doppelbindungen* vorhanden sind. Besteht das Molekül ausschließlich aus kondensierten Sechsringen, so bewirkt der gleichartige Anschluß eines neuen Ringes (damit die Steigerung des C-Gehaltes) eine Vermehrung der Doppelbindungen. Bei sonst gleichbleibender Struktur beobachtet man dann, daß die Schichtenfolge im Aluminiumoxyd-Chromatogramm, *von oben nach unten, mit der Verminderung der Ringzahl* parallel geht, z. B.:

Oben:	Naphtacen	$C_{18}H_{12}$:	4 Ringe, 9 F (Formel III),
	Anthracen	$C_{14}H_{10}$:	3 Ringe, 7 F (II),
unten:	Naphtalin	$C_{10}H_8$:	2 Ringe, 5 F (I).

Nach dem gleichen Prinzip verläuft die Zonenbildung aus einem Gemisch der folgenden vier Kohlenwasserstoffe, von denen Benzpyren im oberen Säulenbezirk, Phenanthren im Filtrat angereichert wird, so daß eine Wiederholung des Adsorptionsversuches schließlich zu einer annähernd vollständigen Trennung führen muß:

Oben:	1,2-Benzpyren[1]	$C_{20}H_{12}$:	5 Ringe, 10 F (VII),
	Chrysen	$C_{18}H_{12}$:	4 Ringe, 9 F (VI),
	Pyren	$C_{16}H_{10}$:	4 Ringe, 8 F (V),
unten:	Phenanthren	$C_{14}H_{10}$:	3 Ringe, 7 F (IV).



I. Naphtalin. II. Anthracen. III. Naphtacen.

IV. Phenanthren. V. Pyren. VI. Chrysen. VII. 1,2-Benzpyren (= „3,4-Benzpyren").

Als ein weiterer Beleg sei noch das folgende Chromatogramm angeführt:

[1] Wird auch 3,4-Benzpyren genannt.

Oben: 1,2 : 2′,3′-5,6 : 2″,3″-Dinaphtanthracen $C_{30}H_{18}$: 7 Ringe, 15 F (X),
1,2-Benz-5,6-(2′-3′-naphto)-anthracen $C_{26}H_{16}$: 6 Ringe, 13 F (IX),
unten: 1,2,5,6-Dibenzanthracen $C_{22}H_{14}$: 5 Ringe, 11 F (VIII).

VIII.
1,2,5,6-Dibenz-anthracen.

IX.
1,2-Benz-5,6-(2′,3′-naphto)-anthracen.

X.
1,2: 2′,3′-5,6: 2″,3″-Di-naphtanthracen.

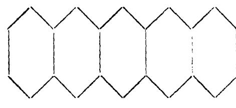
So eindrucksvoll die erwähnte einfache Regel ist, so reicht sie zur Erklärung der Verhältnisse in vielen Fällen nicht aus, sondern man erkennt besondere Strukturelemente, durch welche die Adsorbierbarkeit in hohem Maße gesteigert wird, weit über das Erwartete hinaus. Als ein solcher Faktor erwies sich jener merkwürdige Zustand, in welchem die beiden mittleren, *meso*-Stellen des Anthracens sich befinden; man denke nur an ihr überraschendes Additionsvermögen. Der an jenen Stellen vorhandene, *radikalartige Zustand* (nach CLAR ungepaarte Elektronen) ist nach WINTERSTEIN und SCHÖN (2) mit einer *Stärkung der Adsorptionsaffinität* verknüpft.

Nur so wird es verständlich, daß das 1,2-Benzpyren (5 Ringe, 10 F, Formel VII, S. 29) im Chromatogramm tiefer steht als Naphtacen (4 Ringe, 9 F, Formel III, S. 29). Im Molekül des ersteren erscheint nämlich gerade eine meso-Stelle von dem anschließenden Ringsystem als besetzt, wodurch dort die „normalen" Valenzverhältnisse hergestellt werden.

Wir gehen nun zur Erörterung der *Beziehungen zwischen Struktur, Adsorptionsaffinität und Farbe über*, welche sich auf dem behandelten Gebiet ergeben haben.

Da der erwähnte, radikalartige Zustand sowohl mit einer bedeutenden Farbvertiefung als auch mit einer Steigerung der Adsorbierbarkeit einhergeht, kommen auch Farbtiefe (z. B. die Lage des langwelligsten optischen Schwerpunktes) und Adsorptionsaffinität miteinander in Zusammenhang. Dies wirkt sich, wie bei den Carotinoiden, in dem Sinne aus, daß gewisse, tiefer gefärbte Kohlenwasserstoffe in der TSWETTschen Säule höher stehen als ihre Verwandten, welche kurzwelliger absorbieren. Dasselbe gilt, wenn die Extinktionsmaxima in das Unsichtbare verschoben sind.

Bezeichnend ist z. B. der Fall des orangeroten *Naphtacens* (III, S. 29). Nach CLAR wird der radikalartige Zustand des Anthracens durch den *linearen* Anschluß eines weiteren Benzolkernes noch bedeutend gesteigert. Demgemäß zeigt sich eine Stärkung der Adsorptionsaffinität in der Säule: das Naphtacen (2,3-Benzanthracen) wird fester fixiert als alle anderen vierkernigen Kohlenwasserstoffe der Reihe. Sogar unter den pentacyclischen Verbindungen nimmt nur das gleichfalls linear gebaute 2,3,6,7-Dibenzanthracen einen höheren Platz als Naphtacen ein.



2,3,6,7-Dibenzanthracen.

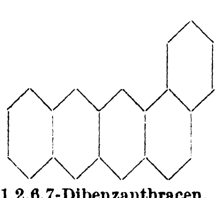
Weitere Beispiele:

a) Oben: Naphtacen (orangerot, III, S. 29),
unten: Chrysen (farblos, VI, S. 29).

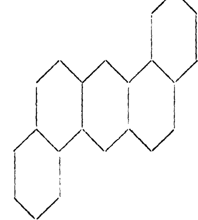
b) Oben: Naphtacen (orangerot, III, S. 29),
unten: 1,2,6,7-Dibenzanthracen (orangegelb, Formel folgt).

c) Oben: 1,2,6,7-Dibenzanthracen (orangegelb),
unten: 1,2,5,6-Dibenzanthracen (farblos, Formel folgt).

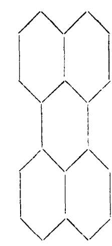
Die Differenz im Adsorptionsverhalten der beiden letztgenannten Isomeren dürfte dadurch bedingt sein, daß im einen Fall vier, im anderen nur drei Ringe linear angeordnet sind. Ein angularer Anschluß vermindert nämlich nach CLAR den anormalen Zustand, also auch die Farbtiefe.



1,2,6,7-Dibenzanthracen.



1,2,5,6-Dibenzanthracen.

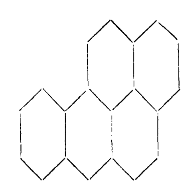

1,2-(2',3'-Naphto)-anthracen.

Ein typisches Ergebnis zeigte sich auch bei den folgenden, gelungenen Trennungen:

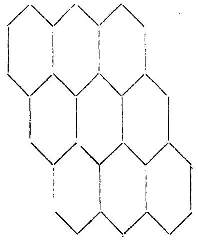
d) Oben: 1,2,6,7-Dibenzanthracen (orangegelb, Formel S. 31),
unten: 1,2-(2',3'-Naphto)-anthracen (blaßgelb).

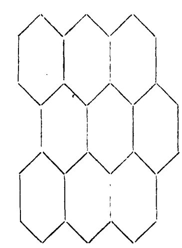
Es sei betont, daß die Chromatographie mit c) und d) öfters wiederholt werden muß, da die Adsorptionsdifferenzen bereits gering sind. Führt man in das zuletzt erwähnte Paar noch je einen Benzolring ein, so versagt die Trennungsmethode völlig.

e) Oben: Perylen (orangegelb, Formel nachstehend),
unten: 1,2-Benzpyren (blaßgelb, Formel nachstehend).


Perylen. 1,2-Benzpyren (= „3,4-Benzpyren“).

Perylen und 1,2-Benzpyren sind isomer ($C_{20}H_{12}$), pentacyclisch und ohne freie meso-Lage; der Grund ihrer gelungenen Scheidung ist noch unklar. Daß die Adsorptionsaffinität in der besprochenen Körperklasse selbst von feinen strukturellen Unterschieden stark abhängt, kann auch mit der chromatographischen Trennbarkeit von anti-diperi-Dibenzcoronen und Anthro-dianthren belegt werden.


anti-diperi-Dibenzcoronen.


Anthro-dianthren.

Zusammenfassend sei vermerkt, daß die WINTERSTEINschen Untersuchungen einerseits die Grenzen der Anwendbarkeit des

Tswettschen Verfahrens innerhalb einer scharf umrissenen Stoffklasse abstecken und anderseits dartun, daß hier Farbvertiefung sowie die Steigerung der Adsorbierbarkeit auf die gleiche strukturelle Ursache zurückzuführen sind.

Die entscheidende Anzahl von Doppelbindungen bildet nur einen leicht feststellbaren Spezialfall einer umfassenderen Gesetzmäßigkeit.

4. Azofarbstoffe.

Mit Rücksicht auf die außerordentlich große Anzahl der hierher gehörenden Körper wird die adsorptionsanalytische Klärung des Gebietes noch ausgedehnte Untersuchungen erfordern. Bereits jetzt liegen interessante Ergebnisse von Ruggli und Jensen (1, 2) vor, aus deren Arbeit die folgenden Angaben entnommen sind (Einzelheiten s. auch S. 152 sowie besonders bei Jensen).

Ist der sonstige Bau des Farbstoffes in großen Zügen festgelegt, so wird die Adsorptionsaffinität mit der *Anzahl der Azogruppen* parallel wachsen; so ergab sich z. B. die Schichtenfolge (wäßrige Lösung, Al_2O_3-Säule, was auch für das weitere Versuchsmaterial gilt):

Stärkste Ads.	Diamingrün G (Trisazo-farbstoff),
↓	Kongorot rein (Disazo-farbstoff),
schwächste Ads.	Diaminrosa FFB (Monoazo-farbstoff).

Sehr schön sieht man diesen Einfluß in jener azohomologen Reihe, deren Vertreter nacheinander entstehen, bei dem schrittweisen Diazotieren und alkalischen Kuppeln der „J-Säure“ (2-Amino-5-naphtol-7-sulfosäure) bzw. der daraus entstandenen Farbstoffe:

HO_3S— —NH_2
OH

„J-Säure“.

NaO_3S— —N NaO_3S— —NH_2
N
OH OH

Diazotierte J-Säure mit J-Säure gekuppelt („2 J-Säure“).

NaO_3S—[Naphthalinring]—N=N—NaO_3S—[Benzolring]—N=N—NaO_3S—[Naphthalinring]—NH_2, je mit OH

„3 J-Säure" (usw.).

Die nach dem Schema

$$J\text{-}Säure\text{-}(N=N\text{-}J\text{-}Säure)_n$$

zusammengesetzten Farbstoffe schichten sich in der nachstehenden Art (je 0,8 g in 250 cm^3 Wasser, mit 750 cm^3 entwickelt):

Stärkste Ads.	$n = 4$,	Zone dunkelviolett,
↓	$n = 3$,	„ heller violett,
	$n = 2$,	„ rötlich-violett,
schwächste Ads.	$n = 1$,	rotoranges Filtrat.

Ein durch Selbstkuppelung entstandener Farbstoff mit zweifelhafter Struktur (n unbekannt) schiebt sich nach $n = 2$ ein.

Bei *gleichbleibender Anzahl der Azogruppen* fanden RUGGLI und JENSEN (1, 2) weitere Faktoren, durch welche die Adsorptionsaffinität wesentlich beeinflußt wird:

a) Ein *β-ständiges Hydroxyl* scheint im Naphtalinkern stärker zu wirken als ein α-Hydroxyl, z. B. steht das Natriumsalz der 2-Naphtol-4-sulfosäure im Chromatogramm höher als 1-Naphtol-4-sulfosaures Natrium.

(Oben.) [Naphthalinring mit —OH und SO_3Na] [Naphthalinring mit OH und SO_3Na] (Unten.)

b) Eine *β*-ständige *Amino*gruppe bewirkt, bei sonst analoger Struktur, kräftigere Adsorption als eine α-ständige, z. B.:

Stärkste Ads.	Kupplungsprodukt von diazotiertem Benzidin und 2 Molen:	2-Amino-8-naphtol-6-sulfosäure
↓		2-Amino-5-naphtol-7-sulfosäure
		6-Amino-2-naphtol-4-sulfosäure
		1-Amino-8-naphtol-4-sulfosäure
schwächste Ads.		1-Amino-5-naphtol-7-sulfosäure

(Die beiden letzteren Farbstoffe sind ungefähr gleich stark adsorbierbar.)

Alle diese Verhältnisse gelten natürlich nur für wäßrige Lösung und bei Anwendung von Aluminiumoxyd. Entfernt man die Sulfogruppen und arbeitet in nichtwäßrigem Medium, so gestalten sich die Adsorptionskräfte vielfach ganz anders.

c) *o-Oxy*azofarbstoffe werden besser adsorbiert als *p-Oxy*azofarbstoffe. Dieser letztere Einfluß gewinnt bei dem folgenden Beispiel die Oberhand; die beiden nachstehenden Verbindungen werden nämlich gleich stark fixiert, trotz der β- bzw. α-Lage der Hydroxylgruppe.

OH

—$N{=}N \cdot C_6H_4 \cdot SO_3Na$

$N{=}N \cdot C_6H_4 \cdot SO_3Na$

—OH

Orange II.

Bedeutend schwächer wird hingegen Orange I festgehalten, infolge seiner *p*-ständigen Kupplungsstelle.

OH

$N{=}N \cdot C_6H_4 \cdot SO_3Na$

Orange I.

d) Wie schwer es ist, bei verwickelt zusammengesetzten Farbstoffen das Verhalten in der Säule bzw. die Trennbarkeit von anderen Vertretern vorauszusagen, sei mit folgendem Beispiel belegt. Erika B und Erika G extra sind adsorptionsanalytisch nicht trennbar, während Direkthimmelblau grünlich und Direktblau 2B sich sehr gut scheiden lassen, obzwar die Strukturunterschiede nicht viel größer sind als bei dem erstgenannten Paar. Vielleicht geben hier die Methoxyle den Ausschlag (vgl. S. 36).

5. Die Gruppe des Fluoresceins

zeigt nach RUGGLI und JENSEN (1) eine starke Abhängigkeit des Verhaltens von dem *Halogengehalt*, indem die Adsorptionskraft mit der Anzahl und dem Atomgewicht des Halogens wächst. Da

Erika B chromatographisch nicht trennbar von *Erika G extra.*

Direkthimmelblau grünlich (trennbar von Direktblau 2 B).

Direktblau 2 B.

auch die Farbvertiefung von dem gleichen Faktor bestimmt wird, sieht man auch hier eine Parallele zwischen Farbtiefe und Stellung im Chromatogramm (Wasser, Al_2O_3):

Stärkste Ads.	Rose bengale (4 J, 2 Cl),
↓	Phloxin (4 Br, 4 Cl) und Erythrosin (4 J),
	Sprit-eosin (Eosin-methylester, 4 Br) und Eosin (4 Br),
schwächste Ads.	Fluorescein (halogenfrei).

Zweites Kapitel.

Methodik.

Adsorptionsmittel.

Theoretisch kann jeder pulverisierbare oder sonst fein zerteilbare Stoff und auch faseriges Material als Adsorbens dienen, vorausgesetzt, daß es in dem angewandten Solvent unlöslich ist und weder auf das letztere noch auf die festzuhaltenden Verbindungen in störendem Sinne einwirkt. Bereits TSWETT (1) prüfte über 100 Adsorptionsmittel.

Es hat sich jedoch gezeigt, daß im allgemeinen eine engere Auswahl hinreichend ist. Zunächst entfielen die meisten *organischen* Materialien aus praktischen Gründen, da man sie nur vorsichtig trocknen und durch Ausglühen nicht regenerieren kann. Außerdem enthalten manche derartige Präparate kleine Mengen löslicher Begleiter, die man durch eine lästige Vorextraktion entfernen muß. Bisher haben sich aus dieser Stoffklasse Inulin und Puderzucker bewährt, die beide schon TSWETT (1) empfahl. Mitunter wird Milchzucker angewandt. Die Anzahl der organischen Adsorbenzien dürfte indessen noch steigen. Verschiedene Möglichkeiten sind derzeit unausgenutzt, so kündigen RUGGLI und JENSEN (1) chromatographische Versuche mittels Baumwolle an.

Auf dem Gebiete der *anorganischen* Adsorptionsmittel kommen die sehr stark sauren oder basischen Verbindungen im allgemeinen außer Betracht, meist auch dunkle oder starkgefärbte Substanzen, auf denen die Schichtenfolge sich schwer erkennen läßt. Sollen die einzelnen Komponenten direkt aus der unzerteilten Säule herausgelöst werden, so entfällt die letztere Beschränkung.

Bei der *Wahl des Adsorptionsmittels* verfährt man empirisch, es gibt jedoch bereits Literaturangaben in genügender Zahl, welche innerhalb gewisser Stoffklassen wegleitend sind.

Natürlich ist nicht nur die chemische Beschaffenheit der Säule entscheidend, sondern ganz besonders ihre *Qualität*. Wie bekannt, wirken Präparate verschiedener Herkunft, welche den gleichen chemischen Namen tragen, bei Adsorptionsversuchen oft ganz abweichend, in quantitativer, sogar auch in qualitativer Hinsicht. Vor allem spielt hier die Ausdehnung und die Beschaffenheit der

Oberfläche des einzelnen Teilchens eine Rolle; ferner gibt es unbekannte Faktoren, welche die Verwendung eines ganz bestimmten Präparates, z. B. einer Handelsmarke, bevorzugen lassen. Die Anwesenheit chemischer Verunreinigungen ist nicht unbedingt von Nachteil.

Stark wirksame Adsorptionsmittel nennt man „*aktive*". Es kann eine planmäßige „Aktivierung", mitunter auch eine „Desaktivierung" vorgenommen werden (S. 41).

Für die ganz speziell eingestellten Zwecke der Chromatographie ist die Verwendung einer höchstaktiven Rohrfüllung nicht immer günstig, im Gegensatz zu älteren Adsorptionsverfahren und zu mancher modernen Reinigungsoperation des Großbetriebes. Wirkt nämlich die feste Phase allzu energisch, so nimmt sie zwar die in der Lösung vorliegenden Inhaltsstoffe zuverlässig auf und fixiert sie stark, aber gerade durch diese energische Bindungsart werden die feinen Unterschiede der einzelnen Adsorptionsaffinitäten in grober Weise überdeckt. Die Komponenten bleiben zusammengedrängt, sie vermögen keine klar abgegrenzten Bezirke zu bilden, auch nicht, wenn entwickelt wird. Die auf S. 15 erwähnten Verdrängungsvorgänge kommen ungenügend zur Geltung, weil den zahllosen, gleichzeitig verlaufenden Einzelelutionen ein Widerstand gesetzt ist. Auch die am Schlusse des Versuches vorzunehmende Elution der einzelnen Bezirke kann erschwert sein oder mißlingen.

Was man also bei der TSWETTschen Arbeitstechnik von einem Adsorbens meist verlangt, liegt auf einer mittleren Linie: gute Festhaltung der Komponenten, welche jedoch imstande sein sollen, beim Waschen mit mäßiger Geschwindigkeit abwärts zu wandern und sich dabei zu scheiden. Dann verläuft auch die Elution der einzelnen Verbindungen zufriedenstellend.

Natürlich läßt sich der Versuch auch so leiten, daß man nacheinander verschiedene Adsorptionsmittel in getrennten Ansätzen verwendet. Man kann z. B. den Gesamtfarbstoff, zur Abtrennung von weißen Begleitern, im Rohre festhalten, zunächst unter Verzicht auf eine feinere Aufteilung, was nachher auf schwächer oberflächen-aktivem Material vorgenommen wird.

Dispersität. Es seien zunächst einige Korngrößen verzeichnet, die sich teils auf die im Laboratorium der Verfasser gebräuchlichen Materialien beziehen (Tabelle 8). Die Zahlen besitzen daher nur

einen orientierenden Wert. Sie bedeuten den mittleren Durchmesser der Hauptmenge, wobei auch Körnchen mit recht stark abweichenden Maßen zugegen sein können.

Tabelle 8. Durchschnittliche Teilchengröße einiger Adsorptionsmittel.

Adsorptionsmittel	Teilchengröße (μ)
Aluminiumoxyd Merck, standardisiert nach BROCKMANN	7
Aluminiumoxyd käuflich, selbst gepulvert	2
Adsorptionston aus Java (acid clay)[1]	10
Calcium carbonicum praecipitat. Merck	1,5
Calcium carbonicum laeviss. des Handels	1,2
Calciumhydroxyd, selbst bereitet	2,5
Gips (wasserhaltig)[2]	10,5
Magnesiumoxyd[3]	1,5
Bleicherde	3
Floridin	1,5—7
Floridin XXF	1,5—6

Die Dispersität der Säulenfüllung soll gewöhnlich nicht allzu ungleichmäßig sein, da sonst die feinsten Teilchen sich fast wie ein anderes Adsorptionsmittel verhalten und zu stark wirksam sein können. In einem Ausnahmefall findet allerdings KOSCHARA (4), daß ein Farbstoff gerade von den gröberen Al_2O_3-Körnern besonders stark (irreversibel) festgehalten wird. Hier ist eine chemische Verschiedenheit der größten Teilchen naheliegend.

Der *Anwendungsbereich* mancher Adsorptionsmittel läßt sich manchmal recht fein *abstufen*, wenn man eine gröbere und eine feinere Sorte in verschiedenen Gewichtsverhältnissen mengt. So erwies sich das Gemisch 20 : 1 von Calcium carbonicum praecipitat. Merck und von Calcium carbonicum laeviss. der pharmazeutischen Praxis für die Verarbeitung von gewissen Polyenalkoholen als sehr günstig, während es für die Festhaltung von Farbwachsen (ver-

---

[1] Angabe von EULER und GARD. Dieser Ton ist ein Ca-Al-Mg-Silicat. Die Oberfläche von 1 g liegt in der Nähe von 10 m^2 und ist doppelt so groß wie diejenige des von BOWDEN und BASTOW angewandten Silicapulvers.

[2] Nach KARRER und WEBER.

[3] Enthält auch ziegelförmige Krystalle (etwa 3—14 μ).

esterten Polyenalkoholen) ungenügend wirksam ist. Für den letzteren Zweck wähle man das Mischungsverhältnis 5 : 1 bis 4 : 1. Im Falle eines Quotienten 1 : 1 wird aus Benzin sogar der Kohlenwasserstoff Lycopin fixiert, welcher sonst durch die $CaCO_3$-Säule läuft. Zur Festhaltung der Carotine ist selbst das letztere Gemisch zu wenig aktiv und unbrauchbar (ZECHMEISTER und CHOLNOKY 2).

Ganz verschiedene Anforderungen werden an ein Adsorbens gestellt, je nachdem es in *wasserfreiem* oder in *wasserhaltigem* Milieu gebraucht werden soll. In ersterem Falle ist ein Feuchtigkeitsgehalt der Säulenfüllung meist schädlich und muß dann ausgeschaltet werden, nämlich durch Erhitzen und nachherigem Aufbewahren bei Luftabschluß. (Durch eine solche Vorbereitung kann auch die Aktivität beeinflußt werden.) Führt man den Versuch in wäßriger oder wasserhaltiger Lösung aus, so darf das Adsorptionsmittel kein Wasser binden, nicht quellen usw., da sonst Risse in der Säule entstehen und außerdem der Abfluß verstopft werden kann. Auch wird das Herauspressen der Säule erschwert. Aus diesem Grunde ist der sonst vielfach verwendbare Kalk hier ungeeignet. Man kann übrigens den Kunstgriff gebrauchen, daß man z. B. wasserhaltigen Gips in das Rohr füllt (KARRER und WEBER, S. 147). Es ist verständlich, daß in die Adsorptionsanalyse wäßriger Lösungen zunächst diejenigen Handelsprodukte Eingang gefunden haben, welche vom Großbetrieb bei Reinigungs- und Entfärbungsoperationen seit längerer Zeit verwendet werden, z. B. Bleicherden.

Nachfolgend stehen einige *spezielle Angaben* über die wichtigsten Adsorptionsmittel, die derzeit öfters in Gebrauch sind.

Puderzucker, schon von TSWETT (1) angewandt, dient zur Trennung der Chlorophylle. Es gibt Sorten, die stärker, und solche, die schwächer adsorbieren als *Milchzucker* (WINTERSTEIN und STEIN 2). Milchzucker: S. 173.

Aluminiumoxyd (auch hydratisiert) ist eines der meist verwendeten Adsorptionsmittel, sowohl in wäßrigem als auch in wasserfreiem Medium gut brauchbar. Die nach verschiedenen Verfahren hergestellten Präparate bzw. Handelswaren zeigen große Schwankungen in bezug auf ihre Adsorptionskraft, so daß die Qualität des Materials stets genau definiert werden sollte.

Die *Fasertonerde* nach WISLICENUS (Merck, aus dem Amalgam bereitet) ist allein sehr stark, mit anderen Sorten vermengt noch immer kräftig wirksam, jedoch für größere Versuche viel zu teuer.

Das *Aluminiumoxyd* der Firma Merck, „*standardisiert nach* BROCKMANN", zeichnet sich durch eine sehr willkommene Konstanz seiner Eigenschaften aus, da es durch Erhitzen auf einen bestimmten Wassergehalt gebracht und mit Hilfe geeigneter Farbstoffe auf den gewünschten Aktivitätsgrad eingestellt wird. Dieses Produkt ist ebenfalls nicht billig und wird oft im Gemisch mit gewöhnlichen Handelspräparaten angewandt. Öfters genügt das preiswerte Aluminiumoxydhydrat oder Aluminium oxydatum anhydricum aus guter Bezugsquelle.

„*Hydralo*", ein amerikanisches Trocknungsmittel, wird von STRAIN (2) empfohlen und soll stärker wirken als Fasertonerde.

HOLMES, LAVA, DELFS und CASSIDY haben ausführliche Angaben über die Wirksamkeit verschiedenartig hergestellter Präparate gemacht, von welchen einige Handelssorten sind. Die Adsorptionsmittel wurden meist durch das 200er Sieb geschickt und 2 Stunden bei 200° im Kohlendioxydstrom aktiviert; Luft- und Wassergehalt lassen sich so verdrängen.

Beispiele. a) Ein Handelsprodukt wurde alkalifrei gewaschen und aktiviert. — b) Krystallwasserhaltiges Aluminiumnitrat wird so lange (einige Stunden) zwischen 200—300° gehalten, bis kein NO_2 mehr entweicht. — c) Man versetzt $AlCl_3$ mit einem kleinen Überschuß von Ammoniak, trocknet die Lösung im Verlaufe von 2—3 Monaten ein, wäscht den Rest chlorfrei und siebt. — d) Auf Glas ausgebreitetes Aluminiumäthylat wird unter gelegentlichem Umkneten in einem warmen, feuchten Raum 5 Wochen aufbewahrt, 3 Stunden in trockenem CO_2-Strom auf 210° erhitzt, bis kein Dampf mehr entweicht, gepulvert und nochmals aktiviert. — e) Es wurden auch Präparate auf Bimsstein bereitet, nämlich durch langsame Hydrolyse von Aluminium-alkoholaten.

Für die praktischen Zwecke der Chromatographie sind derartige Arbeitsweisen zu langwierig.

Wesentlichen Fortschritt bedeutet ein einfacher, von RUGGLI und JENSEN (1, 2) erfundener Kunstgriff zur *Aktivierung*, die darin besteht, daß man das Oxyd mit *Leitungswasser* bespült und eventuell noch stark erhitzt. Für die meisten Zwecke reicht 1 Behandlung aus, welche aber, falls sie für die betreffende Aufgabe noch nicht genügt, nach Belieben wiederholt werden kann. Da eine Bespülung mit destilliertem Wasser unwirksam ist, handelt es sich hier offenbar um die Beladung des Adsorbens mit einer Spur Kalk. Das Verfahren hat den Vorteil, daß man die Wirksamkeit der Säulenfüllung abstufen kann; so haben KARRER und STRONG

für die Chromatographie von Anthocyanen ein nur schwach aktiviertes Aluminiumoxyd als günstig befunden.

Es kommt, wenn auch seltener, vor, daß die Oberfläche des verfügbaren Materials allzu stark wirkt und *desaktiviert* werden muß. Dies erreicht man nach HEILBRON und PHIPERS dadurch, daß z. B. die nach BROCKMANN standardisierte Handelsware mit Methanol gewaschen und an der Luft getrocknet wird.

Die Herstellungsmethoden für zuverlässig wirkende Oxyd- und Hydroxydpräparate sind, auch industriell, noch entwicklungsbedürftig. BROCKMANN (3) kündigt die Einführung eines hochaktiven Aluminiumhydroxyds „III" an.

Magnesiumoxyd wurde u. a. von EULER und GARD und namentlich von STRAIN (1—5) empfohlen. Es wirkt ganz verschieden energisch, je nach der Bereitungsart. Verbrennt man einfach das Metall, so besitzt das Oxyd eine nur geringe Sorptionskraft. Auch das Erhitzungsprodukt des Carbonats, bei höherer Temperatur gewonnen, wirkt nur mittelmäßig. Zu einem weit besseren Ergebnis führt die Wasserabspaltung aus Magnesiumhydroxyd, bei nicht zu hoher Temperatur. Ein amerikanisches Handelsprodukt („Micron Brand magnesium oxyde Nr. 2641") wird empfohlen. Nach unserer Erfahrung genügt die allgemein käufliche Ware für die meisten Zwecke.

Weitere Magnesiumverbindungen als Adsorptionsmittel: EULER und GARD.

Calciumhydroxyd. Nach KARRER und WALKER (1) ist käuflicher, gelöschter Kalk ein ausgezeichnetes Adsorbens und besitzt, ebenso wie das gelegentlich angewandte *Oxyd*, den Vorzug der großen Billigkeit. Für die Aufteilung wasserhaltiger Flüssigkeiten ist er natürlich unbrauchbar (Verstopfung; wenn das Löschen nicht vollständig war: Aufblähen der Masse). In unserem Institut wird käuflicher Kalk durch Besprengen mit Wasser nur soweit gelöscht, bis er gerade zerfällt. Man schickt das Material durch ein 120maschiges Sieb, oder, falls höhere Dispersität erwünscht ist, durch ein 180maschiges. Aufbewahrung des hygroskopischen Produktes bei Luftabschluß. Vor der Entnahme wird die Stöpselflasche gut durchschüttelt, um den erhöhten Carbonat- und Feuchtigkeitsgehalt der oben liegenden Schicht gleichmäßig zu verteilen.

Calciumsulfat (wasserhaltig) wird von KARRER und WEBER

bei der Chromatographie von Anthocyanen in wäßrigem Medium benutzt (S. 147).

Calciumcarbonat (von TSWETT oft gebraucht) ist ein milde wirkendes, in vielen Fällen angewandtes Adsorptionsmittel. Über den Einfluß der Dispersität auf das Aufnahmevermögen wurden schon S. 39 Angaben gemacht. Durch entsprechendes Mischen von gröberem und feinerem Carbonat hat man es in der Hand, die Adsorptionskraft jeweils dem Bedarf anzupassen. Feuchte Präparate wirken schlecht und werden nötigenfalls einige Stunden auf 150° erhitzt.

Bleicherden sind technisch angewandte Aluminium-hydrosilicate mit tonähnlichem Charakter, deren Ca-, Mg- und Fe-Gehalt weitgehend variieren kann. Man unterscheidet „Naturerden", die nur mechanisch verarbeitet wurden, und „aktivierte Erden". Die Aktivierung besteht meist in einer technischen Behandlung mit Salzsäure, welche gewisse Bestandteile herauslöst. Die Oberflächenbeschaffenheit (Porosität) gestaltet sich dadurch günstiger. Bei der Aufteilung wäßriger Flüssigkeiten hat KOSCHARA (4, 5) namentlich mit den folgenden Adsorbenzien gute Erfahrungen gemacht:

Frankonit KL: mit HCl aktiviert, ist kongo-sauer (Pfirschinger Mineralwerke, Kitzingen).

Floridin XXF: fein gemahlen, stark wirksam, obzwar unvorbehandelt; hellgrau (H. Bensmann, Bremen).

Floridin XS: dasselbe, aber gröber-dispers, sandartig.

Das vorletzte Floridin-Präparat erwies sich bei den Pterin-Untersuchungen von SCHÖPF und BECKER als zu stark und adsorbierte z. B. das Erythropterin irreversibel. Hierbei spielt wahrscheinlich der Eisengehalt mit, indem das Adsorbat dieselben Farben aufweist, wie die aus sauren Erythropterinlösungen mit Ferrichlorid erhältliche Fällung. Wurde der Eisengehalt des Floridins durch zehnmaliges Auskochen (während je 3—5 Minuten) mit 10 Teilen 3n-HCl vermindert, so zeigte das Material die für den Versuch gerade günstige Adsorptionskraft. Kocht man jedoch mit der Säure weiter, so verschwindet gleichzeitig mit dem Eisengehalt auch die Aufnahmefähigkeit für den Farbstoff.

Fullererden verschiedener Herkunft und Qualität werden ebenfalls verwendet. Sie reagieren ganz schwach sauer und sehen, namentlich mit Flüssigkeit befeuchtet, mehr oder weniger dunkel aus. Eine häufiger gebrauchte Abart ist „LLOYD's Reagens".

Seltener angewandte anorganische Adsorptionsmittel. Es wird hier nicht beabsichtigt, eine vollständige Liste derselben zu geben. In manchen Fällen wurden auch schwerer zugängliche Adsorbenzien verwendet, die ohne Schwierigkeit durch allgemeiner gebräuchliche ersetzt werden könnten.

Wiederholt haben sich bewährt u. a.: *Natriumsulfat* (wasserfrei), *Bleisulfid*, *Talcum*, *Kieselgur*, *Kaolin*, *Silicagel* (unelastisch), ebenso auch *Tonsil* (Moosburger Tonerde). Gewisse Kohlenpräparate wirken kräftig adsorbierend und sind leicht zugänglich, allerdings muß man auf ein sichtbares Chromatogramm verzichten und fraktionierte Elutionen ausführen. Empfehlenswert sind z. B. *Carboraffin* (durch Verkohlen von Nadelholz mit Chlorzink gewonnen) und *Norit* (mit überhitztem Wasserdampf aktivierte Holzkohlensorte); sie können durch Erhitzen im Stickstoffstrom entlüftet werden. Auch gepulverte *Blutkohle* ist verwendbar.

Im Falle eines technischen Materials ist zu prüfen, ob nicht Substanz an das Lösungsmittel abgegeben wird.

Das **Regenerieren** einer gebrauchten Füllmasse ist im Kleinversuch kaum lohnend. Anorganische Stoffe können, eventuell nach guter Durchspülung mit einem geeigneten Lösungsmittel, durch Ausglühen zurückgewonnen werden, namentlich, wenn sie nicht mit schwer verkohlbaren Kohlenstoffverbindungen beladen sind. Man überzeuge sich, daß die Adsorptionsaktivität nicht gelitten hat.

Gebrauchtes *Calciumcarbonat* kann in vielen Fällen durch Ausziehen mit kaltem oder warmem Methanol und Trocknen an der Luft zurückgewonnen werden; es ist dann aber unbedingt nötig, das Material längere Zeit hindurch bei 100—150° zu halten. — Technische Regenerierung von *Bleicherden*, namentlich wenn sie fetthaltig sind: ECKART.

Die mitunter empfehlenswerte gleichzeitige Anwendung von **zwei Adsorptionsmitteln** in demselben Rohr kann entweder so erfolgen, daß man das gesamte Füllmaterial homogen durchmischt, oder wird die Säule teils aus dem einen, teils aus dem anderen Adsorbens aufgebaut, welche man gesondert einstampft (Einzelheiten: S. 60).

Durch die Verwendung einer einheitlichen Mischfüllung will man meist eine mittlere Adsorptionskraft einstellen oder die Durchflußgeschwindigkeit dadurch erhöhen, daß ein gröberes

Material mitverwendet wird. Es sei bemerkt, daß beim Entwickeln oder bei (anteilsweiser) Elution eine Fraktionierung vorgetäuscht werden kann, falls die beiden Füllstoffe allzu abweichend wirken.

Bereitet man *verschiedene Lagen* von, an sich homogenen Adsorptionsmitteln in dem gleichen Rohr, so geschieht dies für Demonstrationszwecke oder um Arbeit zu sparen. Die obere Kolonnenhälfte wird von einer schwächer, die untere von einer energischer wirksamen Substanz gebildet. Der Stoffinhalt des Zwischenfiltrates, welcher in den unteren Bezirk des Rohres gelangt, wird dort abgefangen, so daß man keine zweite Säule zu bereiten braucht.

Als *Beispiele* für die letztere Arbeitsweise seien erwähnt:

a) Calciumcarbonat-Aluminiumoxyd-Säule zur Mikroanalyse von Polyenauszügen, nach KUHN und BROCKMANN (3; Abb. 12, S. 53).

b) Eine Calciumcarbonat-Calciumhydroxyd-Kolonne zur Bestimmung der Paprika-Farbstoffe, nach CHOLNOKY (unveröff.), S. 101.

c) WINTERSTEIN, SCHÖN und VETTER versehen (bei der Bearbeitung von polycyclischen Kohlenwasserstoffen) die Al_2O_3-Säule oben mit einer dünnen Schicht von Aluminiumoxyd + Carboraffingemisch, das gewisse Verunreinigungen stärker zurückhält: S. 167.

d) Drei Adsorptionslagen (oben Zucker, in der Mitte $CaCO_3$, unten Al_2O_3) zur Demonstration der Komponenten des Blattgrüns: Abb. 26, S. 78, nach WINTERSTEIN (1).

Lösungsmittel.

Hier sei zunächst das Arbeiten bei *Wasserausschluß* erörtert, spezielle Angaben über wäßrige Lösungen folgen auf S. 66.

Die *Wahl des Solventen* hängt natürlich in erster Linie von den Löslichkeitsverhältnissen der Substanz ab. Liegt dieselbe bereits gelöst vor, z. B. in Form eines Extraktes, so wird sie nach Vakuum-abdampfen in das günstigste Milieu übergeführt. Arbeitet man mit nichtwäßrigen Flüssigkeiten, so ist es meist vorteilhaft, die Feuchtigkeit wirklich auszuschließen, wenn nötig, durch entsprechende Vorbehandlung des Lösungsmittels. Das Heranziehen von Solventen, die mit Wasser nicht mischbar sind, erscheint von vornherein als günstig. Es ist ein Nachteil der TSWETTschen Methode, aber auch von manchem anderen Adsorptionsverfahren, daß die Lösung im allgemeinen recht verdünnt ist. Das Auskrystallisieren in der Säule muß unbedingt vermieden werden, man geht daher in der Rohlösung selten über einige Prozente des zu ad-

sorbierenden Stoffgehaltes hinaus. Eine Verunreinigung, falls sie nicht aus anderen Gründen störend wirkt, darf natürlich auch in höherer Konzentration vorliegen.

Theoretisch bildet jedes flüssige Medium sowohl ein Adsorptions- als auch ein Elutionsmittel; welche Rolle ihm bei der Chromatographie zugedacht wird, hängt im gegebenen Fall von dem Verlauf der Adsorptionsisotherme ab. Es gelten hier ähnliche Leitgedanken, wie bei der Wahl des Adsorptionsmittels: Wird die Substanz allzu stark fixiert, so bereitet sie bei dem Entwickeln und bei der schließlichen Elution Schwierigkeiten; ist anderseits die im System herrschende Adsorptionsaffinität zu schwach, so läuft die Substanz leicht durch die Kolonne, noch bevor ein zufriedenstellendes Schichtenbild sich ausgestaltet hat. (Unter Umständen wird dies beabsichtigt: „Flüssiges Chromatogramm", S. 65.)

Wie ersichtlich, hat man es durch verschiedenartiges *Mischen von zwei Lösungsmitteln* in der Hand, den Versuch nach Belieben zu leiten (s. z. B. unter „Benzol"). — Meist genügen die nachfolgend erwähnten Lösungsmittel. Hochsiedende Flüssigkeiten sind, wie bei anderen Reinigungsoperationen, unbrauchbar, wenn im Anschluß an den Versuch ein empfindlicher Stoff isoliert werden soll. Ein allzu niedriger Kochpunkt stört wiederum wegen der starken Verflüchtigung. Siedepunkte zwischen 40° und 80° sind günstig.

Schwefelkohlenstoff (Siedep. 46°) wirkt in vielen Fällen, z. B. auf Calciumcarbonat, sehr vorteilhaft. Die technische Ware ist nötigenfalls vorzureinigen. Das andauernde Arbeiten mit diesem Lösungsmittel ist lästig und gesundheitsschädlich, besonders wenn der Experimentator eine große Anzahl von Säulen zu zerschneiden hat; man sorge daher für Ventilation. Ferner wird der Kunstgriff gebraucht, daß man den Schwefelkohlenstoff aus dem fertigen Chromatogramm mit Hilfe von Benzin verdrängt und die Säule erst dann auspreßt.

Benzin bzw. **Petroläther** („Ligroin", „light petroleum", Siedepunkt nicht über 80°) ist gegenwärtig wohl das meistgebrauchte Lösungsmittel, zufolge seiner Reinheit, Billigkeit und sonstigen guten Eigenschaften. Die Kombination Aluminiumoxyd-Benzin oder Calciumhydroxyd-Benzin hat sich oft ausgezeichnet bewährt. Auch reines *Pentan* ist verwendbar (Siedep. 36°).

Benzol (Siedep. 80,4°) wird ebenfalls häufig gebraucht. Es unterscheidet sich von dem Benzin in vielen Fällen dadurch, daß es

stärker eluierend wirkt. Die Verwendung von Benzol + Benzin-Gemischen ergibt sich daher von selbst. Man kann z. B. aus Benzin adsorbieren und mit Benzin + Benzol entwickeln, oder man adsorbiert aus Benzin + Benzol 10 : 1 und entwickelt mit einem Gemisch 3 : 1. Unter Umständen dient reines Benzol zur Elution.

Seltener werden angewandt: *Chloroform*, *Tetrachlorkohlenstoff*, *Dichlormethan*, *Äther*. Der letztere ist meist als Elutionsmittel in Gebrauch und wirkt teils zufolge seines Spritgehaltes. Jedenfalls soll der Äther frei von Peroxyden sein, was bekanntlich durch tagelanges Aufbewahren über einer wäßrigen Ferrosulfatlösung erreicht wird.

Elutionsmittel.

Vor längerer Zeit hat TSWETT festgestellt, daß zahlreiche Adsorbate von *Methyl- oder Äthylalkohol* (auch von Aceton) sofort zerlegt werden. Durch diese Beobachtung wurde das beste, sehr leicht zugängliche Elutionsmittel ermittelt. Meist ist es gar nicht erforderlich, reine Alkohole anzuwenden, sondern es genügt schon ein Zusatz von 0,5—2% zum Solvent, mit dem gerade gearbeitet wird. Oder man eluiert mit schwach methanolhaltigem Äther.

Soll der chromatographische Versuch mit einem Säulenteil oder mit dem gesamten Stoffinhalt wiederholt werden, so eluiert man z. B. mit schwach holzgeisthaltigem Benzin, filtriert vom Adsorptionsmittel, wäscht den Alkohol mit Wasser weg, trocknet und gießt die Benzinlösung auf eine frische Säule. Eindampfungsoperationen werden so vermieden.

Daß die Adsorptionskräfte von niedrigen Alkoholen nicht immer herabgesetzt oder aufgehoben werden, geht aus den S. 138 referierten Pterin-Untersuchungen von SCHÖPF und BECKER hervor; es wurden von diesen Forschern Adsorptionen auch aus methanolischem Medium vorgenommen.

Ist die Elution in besonderen Fällen sehr schwer durchführbar, so wird man ein Auskochen mit niedrigen Alkoholen versuchen. Oft hat sich kaltes *Pyridin* bewährt (allein oder im Gemisch). Es kommt, wenn auch nicht häufig, vor, daß das Adsorbat durch keines der erwähnten Hilfsmittel zerlegt werden kann. Bei säureunempfindlichen Inhaltsstoffen greift man dann zu einem Notbehelf und löst z. B. das Calciumcarbonat in verdünnter Salzsäure, um hierauf die organische Substanz zu extrahieren; Säulen aus Zucker werden in Wasser gelöst.

Gelegentlich der Bearbeitung einer Substanz, welche auf $CaCO_3$ überhaupt nicht, auf $Ca(OH)_2$ uneluierbar fest hängen bleibt, bewährte sich der folgende Kunstgriff: Man chromatographiert auf $Ca(OH)_2$, suspendiert den zerstampften Säulenteil in Wasser und verwandelt durch Einleiten von CO_2 den Kalk in das Carbonat. Die Elution gelang nun ohne Schwierigkeiten (TÓTH, unveröffentlicht).

Apparatur.

Es sind mannigfach Apparate zur Ausführung der Chromatographie empfohlen worden. Von historischem Interesse ist die in Abb. 2 (Nr. 1) dargestellte Vorrichtung von TSWETT (1), die zu

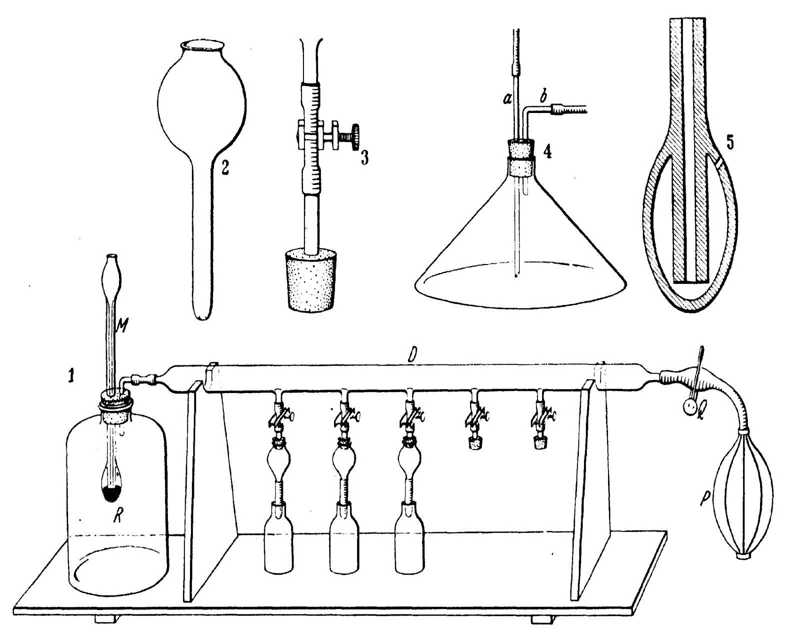


Abb. 2. Originalvorrichtung von TSWETT.

raschen, orientierenden Versuchen mit kleinen Extraktmengen gedient hat. Das Passieren der Säule wird hier nicht mit Hilfe einer Saugpumpe, sondern durch Anwendung von Überdruck erreicht. Man lockert den Quetschhahn *Q*, betätigt den Gummiball *P*, wodurch Überdruck im Leitungsrohr *D* sowie in der Reserveflasche *R* entsteht, was vom Manometer *M* angezeigt wird. An *D* werden

die Adsorptionsröhrchen angeschlossen (konstruiert nach Abb. 2, Zeichnung Nr. 2: die Kolonne befindet sich im unteren, zylindrischen Teil: 30—40 × 2—3 mm). Einzelheiten der Apparatur sind aus den Zeichnungen Nr. 2, 3 und 5 der Abb. 2 ersichtlich, während das Gefäß Nr. 4 die Rolle eines Scheidetrichters spielt und mit der Bereitung des Chromatogrammes nichts zu tun hat.

Zur Verarbeitung etwas größerer Mengen benutzte TSWETT (1) eine, nach der Abb. 3 gebaute Apparatur, die im Prinzip noch heute verwendet wird: *R* nimmt

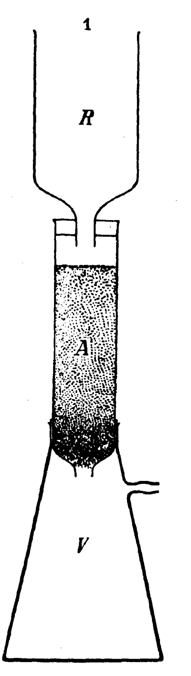


Abb. 3. Adsorptionsvorrichtung von TSWETT für größere Versuche.

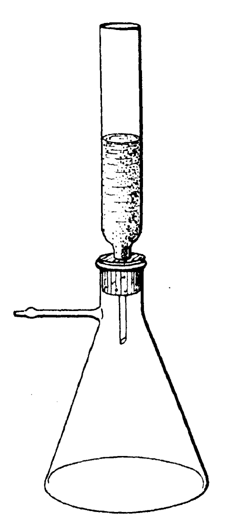


Abb. 4. Einfache Adsorptionsvorrichtung.

die Lösung, *A* (Durchmesser bis zu 3 cm) die Säule auf, in *V* wird Vakuum erzeugt. Das Ausdrücken der Säule ist bei dieser Konstruktion schwer durchführbar.

Ist man nicht im Besitz einer besonders konstruierten Vorrichtung und will kleine Proben ausführen, so montiere man ein einseitig ausgezogenes Glasrohr auf eine Saugflasche (Abb. 4). Freilich wird durch die Form auch dieses Rohres das Ausdrücken der Säule unmöglich gemacht, wenn man nicht das Glas zer-

schneidet. Bei orientierenden Versuchen ist dies öfters entbehrlich. Ferner kann ein schrittweises Abwärtswaschen der einzelnen Scheiben vorgenommen und die Saugflasche entsprechend gewechselt werden (Näheres S. 65). Ein Beispiel hierzu haben schon frühzeitig PALMER und ECKLES mitgeteilt (Abb. 5).

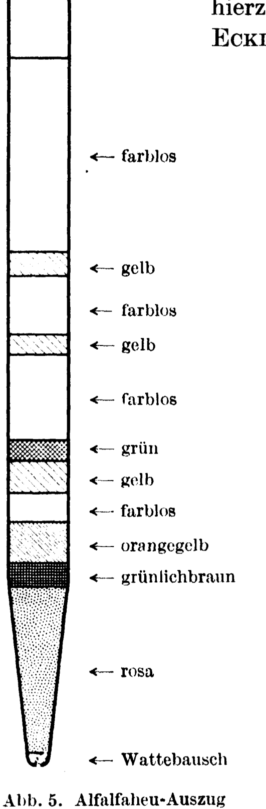


Abb. 5. Alfalfaheu-Auszug in einem einfachen Rohr, auf $CaCO_3$, soweit gewaschen, daß das Carotin durchzugehen beginnt (PALMER und ECKLES).

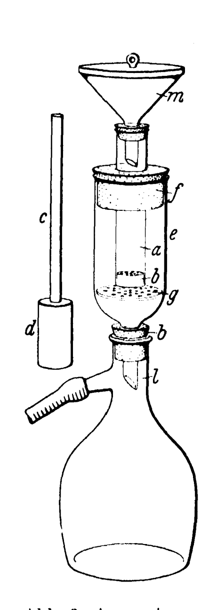


Abb. 6. Apparat von DHÉRÉ und ROGOWSKI (Zeichnung bei ROGOWSKI). Rohr 25×2 cm, Füllhöhe 6—8 cm. Auf dem Korkstopfen Filtrierpapier, darüber 1—2 cm Sand. — Links Holzpistill.

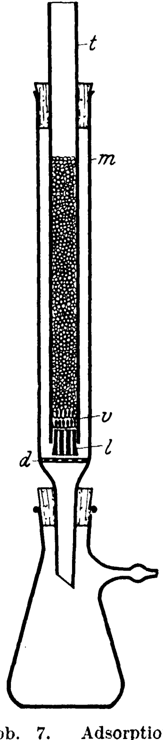


Abb. 7. Adsorptionsvorrichtung nach DHÉRÉ und VEGEZZI (Zeichnung bei VEGEZZI).

Von den heute in Gebrauch stehenden Vorrichtungen verlangt man *ein klagloses Auspressen der unversehrten Kolonne*. Dies wurde zuerst, im Laboratorium von DHÉRÉ, von ROGOWSKI (Abb. 6), ferner von VEGEZZI erreicht: Auf Abb. 7 sieht man im

Inneren des Glaszylinders *m* das eigentliche Adsorptionsrohr *t* (35 × 1,6 cm). Das letztere ist mit Hilfe eines durchlöcherten Korkstopfens befestigt und kann bequem herausgenommen werden. Vor dem Versuch wird es mit dem erwähnten Stopfen abgeschlossen, gefüllt und auf die Siebplatte *d* gestellt (*v* = Glaswolle). Eine Modifikation dieser Einrichtung stammt von WINTERSTEIN und STEIN (1) und ist in Abb. 8 wiedergegeben (*G* = Glasrohr, *K* = engmaschiges Kupferdrahtnetz, *V* = Vorstoß, *D* = weitmaschiges Drahtnetz, *S* = Saugflasche; s. auch Abb. 9).

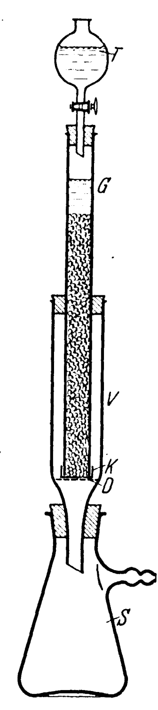


Abb. 8. Vorrichtung nach WINTERSTEIN und STEIN.

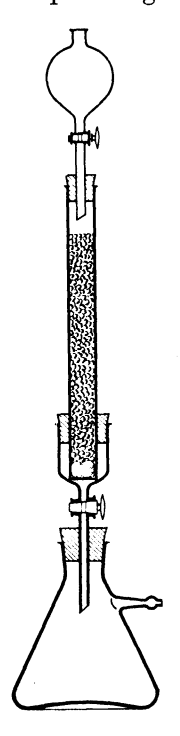


Abb. 9. Vorrichtung nach HESSE.

Ist die Adsorptionsanalyse bei *Luftausschluß* vorzunehmen, also z. B. im Stickstoffstrom, so empfiehlt sich der Apparat von HEILBRON, HESLOP, MORTON, WEBSTER, REA und DRUMMOND (Abb. 10, in *S* leitet man O-freies Gas ein) oder die Vorrichtung nach HOLMES, CASSIDY, MANLY und HARTZLER (Abb. 11, S. 52).

Von KOSCHARA (1) wurde ein gerader Vorstoß (Durchmesser zirka 3 cm) mit eingeschmolzener Glassiebplatte und Rundfilter angewandt.

Zweckmäßig sind *Adsorptionsrohre mit Glasschliff*. Ein solches wurde für analytische Zwecke von KUHN und BROCKMANN (3) vorgeschlagen; die schlanke Kolonne steht auf einem Wattebausch (Abb. 12 und Abb. 13, S. 53). Im Laboratorium der Verfasser hat sich folgende Anordnung bewährt (Abb. 14, 15, S. 54): Man legt auf eine passende Porzellansiebplatte eine kreisrunde, höchstens $^1/_2$ cm dicke Watteschicht (Verbandwatte), deren Durchmesser um 2 cm denjenigen des Porzellans übertrifft. Der ringsum herausragende Wattering wird gleichmäßig nach unten abgebogen und

das Ganze vorsichtig in das horizontal gehaltene Adsorptionsrohr geschoben, das mittels seines Schliffes montiert wird. (Die Hülle vermeidet ein Ritzen der Glaswand beim späteren Auspressen der Füllmasse.) Nach Beendigung des Adsorptionsversuches wird der angeschliffene Unterteil entfernt und die Kolonne in waagerechter

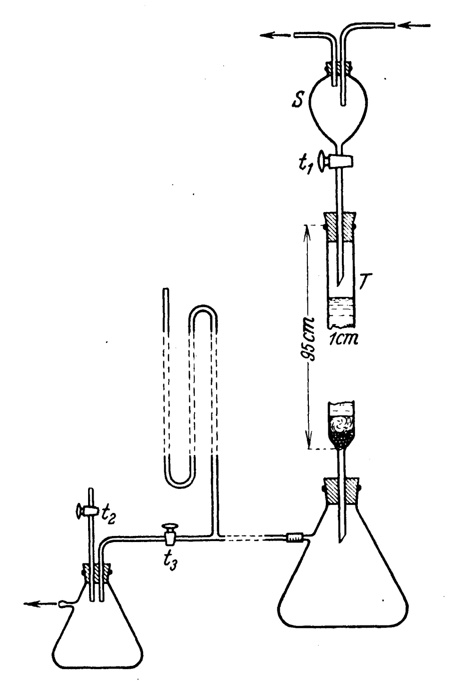


Abb. 10. Vorrichtung nach HEILBRON und Mitarbeitern, zur Adsorptionsanalyse bei Luftausschluß.

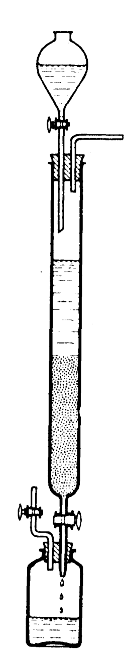


Abb. 11. Vorrichtung nach HOLMES und Mitarbeitern zur Adsorptionsanalyse bei Luftausschluß.

Lage (von dem geschliffenen Ende aus beginnend) mit Hilfe eines Holzpistills (Abb. 23, S. 58) ausgedrückt. Arbeitet man mit Materialien, durch welche das Auspressen (namentlich im Falle wäßriger Flüssigkeiten) erschwert ist, so kann die Porzellanplatte wegfallen. Die mit Watte unterschichtete, adsorbierende Säule wird dann von 3—5 Glasrohrstückchen (z. B. 7 × 1 cm) getragen, die man in den unteren, kurzen Ansatzteil nach Abb. 16 lose einsetzt (S. 55).

Zur raschen, *qualitativen Prüfung* des Verhaltens haben kürzlich SCHÖPF und BECKER Adsorptionsprobierröhrchen eingeführt (Abb. 17, S. 55): Ein Glasrohr (Durchmesser 5 mm) wird nahe dem einen Ende in der Flamme soweit einfallen gelassen, daß noch eine 0,5—1 mm breite Capillare offen bleibt. Man preßt etwas Watte ein, füllt das Adsorbens in das Rohr und saugt schwach an.

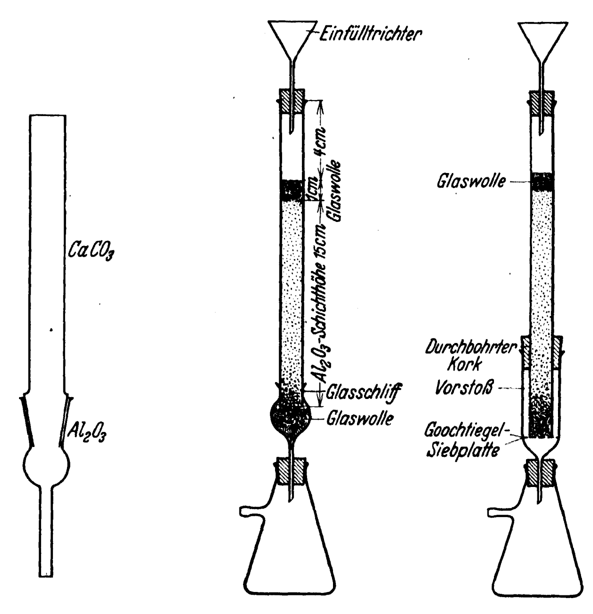


Abb. 12. Adsorptionsrohr nach KUHN und BROCKMANN, für analytische Zwecke.

Abb. 13. Apparate zur Untersuchung des Weines (MOHLER und HÄMMERLE).

Die *Maße des Adsorptionsrohres* betragen meist 15—25 × 1 bis 6 cm, nur Ausnahmsweise werden im Schrifttum größere Dimensionen erwähnt.. So verwenden HEILBRON und Mitarbeiter ein 95 cm, GRASSMANN ein 100 cm langes Rohr (10 cm breit); in den Versuchen von KARRER und STRONG war die Füllmasse 80 cm hoch. Es ist klar, daß der Steigerung des Maßstabes hier eine Grenze gesetzt ist, besonders im Hinblick auf die Widerstände beim Durchtreiben der Lösung sowie beim Auspressen des Adsorptionsmittels.

Selbstredend soll die *Wahl der Rohrgröße* nicht schematisch ge-

troffen werden. Im Interesse eines ungestörten Versuchsablaufes wären breite Kolonnen erwünscht, welche möglichst viel Füllmaterial und eine bedeutende Menge der adsorbierten Substanz fassen, ohne daß die Schichtenhöhe und damit der Widerstand allzu stark anwächst. Bis zu einem gewissen Grad läßt sich dies auch erreichen. Die Vorrichtung versagt jedoch, wenn das bearbeitete Ausgangsmaterial viele Komponenten enthält, von denen einige nur in belanglosen Mengen zugegen sind. Dann ist man auf ein schlankes Rohr an-

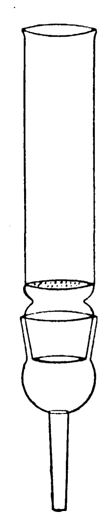


Abb. 14. Adsorptionsrohr mit Schliffansatz und Siebplatte.

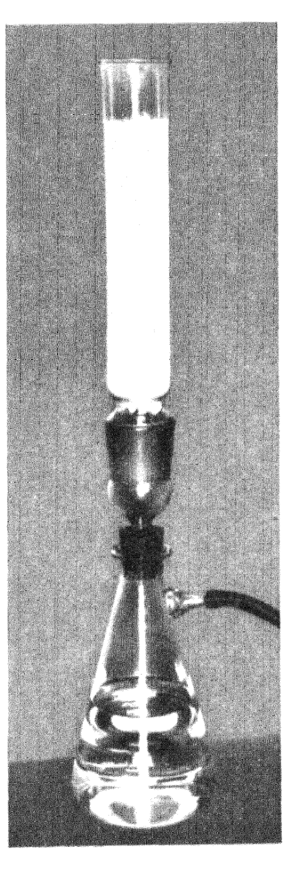


Abb. 15. Adsorptionsrohr mit Schliffansatz und Siebplatte (montiert).

gewiesen, da sonst die einzelnen Farbringe viel zu dünn und voneinander kaum trennbar werden.

Nötigenfalls nehme man eine größere Anzahl von Kolonnen und vereinige die Eluate der jeweils entsprechenden, herausgeschnittenen Ringe. In einem Ausnahmefall haben wir den Stoff-

inhalt von 380 Chromatogrammen verarbeitet (ZECHMEISTER und CHOLNOKY 3).

Liegt hingegen ein einfacher zusammengesetztes Gemenge vor, oder hat man für Nebenzonen kein Interesse, so ist die Verwendung eines kürzeren, breiten Glasrohres empfehlenswert. Man kann übrigens auch eine erste Scheidung in einer geräumigen Apparatur vornehmen, worauf die weiter zu zerlegende Fraktion in einem engen Glasrohr zur endgültigen Analyse gelangt.

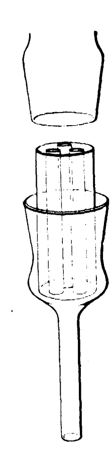


Abb. 16 Adsorptionsrohr mit Schliffansatz, ohne Siebplatte.

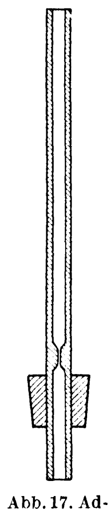


Abb. 17. Adsorptionsprobe-röhrchen.

Bei der Anfertigung aller Adsorptionsrohre ist darauf zu achten, daß die zum Einfüllen dienende Mündung nicht enger, sondern eher eine Spur breiter sei als der Durchmesser des Glaszylinders, da sonst die Säule beim Ausdrücken zerbröckeln kann. Gelegentlich wurden auch schwach konische Rohre empfohlen (unten enger).

Über den gangbaren Maßstab der zur Chromatographie verwendeten Laboratoriumsapparate geht eine von WINTERSTEIN und SCHÖN (3) empfohlene Vorrichtung hinaus, die *mehrere Kilogramme* Pulver faßt und eine dicke, feinporöse Porolith-Filterplatte (Filterwerk, Meißen) besitzt. Ein Chlorophyll-Chromatogramm (Zucker) wird in dieser Apparatur in $1^1/_2$ Stunden fertig; noch wesentlich rascher arbeitet man mit Aluminiumoxyd. Ein 50 cm hoher Glaszylinder *G* (Abb. 18) von 12,5 cm lichter Weite, welcher unten mit einem geschliffenen Flansch versehen ist, wird mittels der Schrauben *S* und des Ringes *R* auf die von einem Gummiring umgebene Porolith-Filterplatte *P* aufgepreßt, welche ein sehr gleichmäßiges Saugen gewährt (S. 56). Die Platte sitzt in dem Metallgehäuse *M*, das mit einem Ablaufstutzen *A* versehen ist. Der letztere wird mittels einer Gummiplatte auf eine Saugflasche montiert. Der Apparat (Fassungsraum: rund 6 kg Adsorbens) steht auf einem Dreifuß.

Für den Fall kleinerer Substanzmengen ist der zweite Apparat von WINTERSTEIN und SCHÖN (3) geeignet (Abb. 19). Das Rohr (25 × 7,5 cm) besitzt unten einen geschliffenen Flansch mit

welchem es auf der von einem Gummiring umgebenen Porolithplatte *P* (Durchmesser 9,5 cm) steht. Die letztere ruht auf einem, mit passendem Schliff versehenen Glastrichter. Die drei Teile des Apparates werden durch zwei Metallringe *R*, mittels der Schrauben *S* zusammengehalten (Lieferfirma: L. Hormuth, Inh. W. Vetter, Heidelberg).

Zum *Einfüllen* wird das Adsorbens z. B. mit Benzin angerührt und portionenweise festgesaugt; die mechanische Trennung der Chromatogrammschichten geschieht durch Abräumen mit einer kleinen Schaufel. Die Verarbeitung großer Stoffmengen gelingt

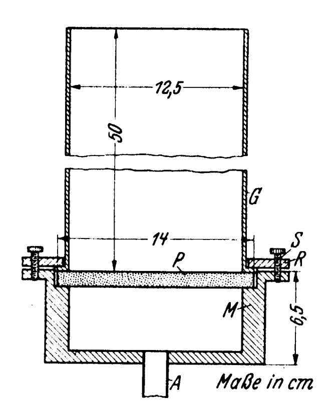


Abb. 18. Apparat nach WINTERSTEIN und SCHÖN (größeres Modell).

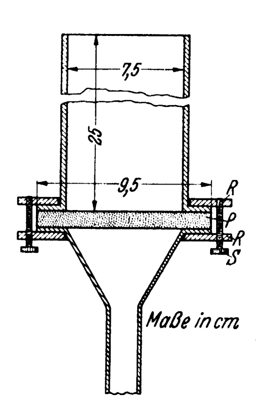


Abb. 19. Apparat nach WINTERSTEIN und SCHÖN (kleineres Modell).

übrigens nach WINTERSTEIN und STEIN (2) einfach in einem schlanken Perkolator, wenn auch wohl diese Arbeitsweise weniger vorteilhaft ist (Höhe z. B. 85 cm, Breite oben 12, unten 7 cm). Der Perkolator wird unten mit Watte, Drahtnetz und Filtrierpapier abgeschlossen und durch eine Saugflasche mit zwei guten Wasserstrahlpumpen in Verbindung gesetzt.

Über Einrichtungen für den Fabriksbetrieb ist unseres Wissens noch nichts bekannt geworden.

Apparate zur Mikro-chromatographie. Um die zu verarbeitenden Substanzmengen stärker vermindern zu können (bis auf $^1/_2$—1 γ), muß vor allem der Durchmesser des Rohres entsprechend klein gewählt werden. Bereits TSWETT (1) ging bis zu 2 mm herab.

HESSE (1) gebraucht ein Mikro-Rohr (Abb. 20), die Maße der Kolonne betragen 30 × 2 mm.

Noch dünner als in der HESSEschen Apparatur ist die Adsorptionssäule von BECKER und SCHÖPF (Abb. 21). An eine dickwandige Capillare (innen 1 mm weit), die unten zur Aufnahme eines Wattepfröpfchens etwas erweitert ist, wird zum bequemen Einfüllen der Lösung ein Glasrohr angeschmolzen (lichte Weite 4—5 mm). Man stellt das Rohr, welches am unteren Ende eine geschliffene Fußplatte besitzt, in einem geraden Vorstoß auf eine Siebplatte und befestigt das Ganze an der Saugflasche. Nach dem Versuch wird eventuell auch das Rohr aufgeteilt.

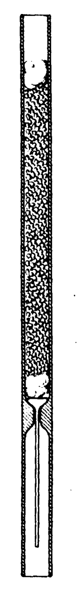


Abb. 20. Mikroadsorptionsrohr (HESSE).

Das Hauptproblem der Mikro-chromatographie liegt nicht in der Zusammenstellung der Apparatur, sondern in der einwandfreien Identifizierung der Substanz.

Beispiele für die Arbeitsweise im Mikromaßstab: S. 141—143.

Abb. 21. Mikroadsorptionsrohr (BECKER u. SCHÖPF).

Gang des Versuches.

Einfüllen der Adsorptionsmasse.

Ein wichtiges Erfordernis für das Gelingen der Analyse ist ein *fest und gleichmäßig gefülltes Rohr.* Wird nämlich das Pulver nicht homogen verteilt, so entstehen Risse und Rinnen, durch welche die Lösung ihren Weg nehmen kann, ohne die zur richtigen Fraktionierung unerläßliche, hohe Anzahl von elementaren Adsorptionen und Elutionen durchgemacht zu haben. Derartig grobe Fehler vermeidet man leicht. Etwas mehr Übung erfordert das Erreichen einer so weitgehenden Homogenität, daß die Einzelzonen des Chromatogramms nicht zu stark verbogen oder verzerrt seien. Unregelmäßigkeiten, wie in den Abb. 34 und 35 (S. 193), sind statthaft, während Abb. 36 (S. 194) ein schlecht gefülltes Rohr wiedergibt.

Namentlich in größerem Versuchsmaßstab zeigen sich ideale Schichtungsverhältnisse nur selten. Es ist dies aber auch nicht notwendig, sondern es genügt, wenn durch die Lage der einzelnen,

klar gezeichneten Bezirke das spätere Zerschneiden ermöglicht wird. Eine nicht selten beobachtete Erscheinung besteht darin, daß die Flüssigkeit entlang der inneren, zylindrischen Glasfläche allmählich vorauseilt, verglichen mit der Strömungsgeschwindigkeit in der Mitte der festen Phase. So ergibt sich die in Abb. 22 wiedergegebene Lagerungsart; dünne, tiefliegende Scheiben können in einem breiten Adsorptionsrohr kappenförmige Gestalt annehmen.

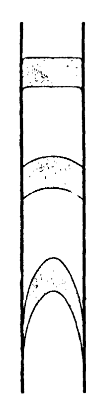


Abb. 22. Schematische Folge verbogener Schichten.

Zur Entfernung gröberer Verunreinigungen aus dem Pulver empfehlen wir, dasselbe durchzusieben, am besten unmittelbar vor der Beschickung des Rohres. Sodann versieht man den Apparat mit der nötigen Stütze für die Kolonne (Wattebausch, Glaswolle, Porzellansieb, Glassinterplatte usw., S. 51) und schüttet das Adsorbens anteilsweise in das vertikal gestellte Rohr.

Abb. 23. Holzpistill.

Das *Feststampfen* jeder einzelnen Portion (die erste soll größer sein als die übrigen) geschieht bei Rohrdurchmessern bis zu 1 bis 2 cm mit einem abgeplatteten Glasstab. In größeren Apparaten, welche für präparative Zwecke meist verwendet werden, bedient man sich eines glattgedrehten, runden *Holzpistills*, dessen Endfläche $^2/_3$ des Rohrquerschnittes ausmacht. Es ist praktisch, das Gerät aus Nußholz, für zweierlei Rohrgrößen anfertigen zu lassen (Abb. 23). Die Endstücke sollen kreisrund, scharfkantig und durch einen ganz schwach konvex gearbeiteten Mittelteil mit dem Stab verbunden sein.

Man stampft nicht allzu stark, mit kleinen, energischen Schlägen (Hubhöhe 3—6 cm). Beim Hochgehen des Pistills wird Vakuum erzeugt und eventuell eine Wolke von feinem Pulver zurückgesaugt. Zwecks Verhinderung dieses Übelstandes hat vor längerer Zeit ROGOWSKI empfohlen, das Holz zu durchlöchern; es genügt jedoch, wenn man beim Heben des Stampfers eine kleine drehende Bewegung macht.

Beispiel. Maße des Glasrohres 30 × 5,5 cm. Es nahm bis zu einer Füllhöhe von 24 cm 550 g Calciumcarbonat auf, das in 21 Portionen

eingestampft wurde: 50 g + 20 × 25 g. Man führte bei jedem Anteil 20 Schläge aus. Gesamtdauer des Einfüllens 10—15 Minuten.

Etwa $^1/_3$—$^1/_5$ des Rohrinhaltes bleibt für die Lösung frei. Die Menge des Adsorptionsmittels wird, im Verhältnis zur aufzunehmenden Substanzmenge, im allgemeinen sehr reichlich bemessen. Man weicht von diesem Grundsatz nur in Spezialfällen ab.

So hat STRAIN (1) zur partiellen Scheidung von α- und β-Carotin nur so viel Magnesiumoxyd angewandt, daß die Menge desselben etwas geringer war, als zur Bindung des gesamten Farbstoffes erforderlich gewesen wäre. Das schwächer adsorbierbare α-Isomere häufte sich im Filtrat an.

Nachdem das Pulver bis zur gewünschten Höhe eingefüllt worden ist, setzt man das Rohr auf eine Saugflasche, läßt die Pumpe laufen, während man die Säule mit dem Holzpistill oben nochmals feststampft: die ganze kreisrunde Oberfläche wird, namentlich entlang der Glaswand, gleichmäßig mit gelinden Stößen bearbeitet (nicht drücken). Diese letzte Vorbereitung dauert 1—2 Minuten und muß so lange (aber nicht länger!) fortgesetzt werden, bis beim Zurückziehen des Pistills keine Staubwolke mehr entsteht. So wird das Entstehen von Luftblasen bzw. Rissen beim nachfolgenden Aufgießen der Lösung vermieden. Bereitet man jedoch eine allzu harte Oberfläche (namentlich auf $CaCO_3$ und ähnlichen Materialien), so kann die Füllung gleichfalls bersten; größere Stücke des Adsorbens schwimmen dann in der Flüssigkeit.

Namentlich beim Gebrauch von geräumigen Vorrichtungen ist das Einstampfen beschwerlich oder unausführbar. WINTERSTEIN und STEIN (1) verfahren daher so, daß sie die mit der Saugpumpe verbundene, lotrecht gestellte Apparatur anteilsweise mit einer Benzin-*Suspension des Adsorptionsmittels* beschicken. Jedesmal wird schwach und schließlich stark gesaugt. Die Oberfläche muß ohne Unterbrechung mit Benzin bedeckt sein. Das Füllen des S. 56 erwähnten Perkolators mit 3 kg Puderzucker erforderte 2 bis 3 Stunden.

CASTLE, GILLAM, HEILBRON und THOMPSON geben an, daß die für die Aufteilung von Vitamin-A-Konzentraten geeignete Calciumhydroxyd-Säule folgend vorbereitet werden muß: Man schüttelt das Material stark mit einigen Raumteilen Benzin, läßt die Suspension $^1/_2$ Stunde stehen, wobei zur Entfernung von Luftbläschen gelegentlich mild geschwenkt wird. Man füllt das Glasrohr anteilsweise und führt die nächste Portion jeweilig erst ein, wenn die vorangehende

sich vollkommen abgesetzt hatte. Die Vorbereitung der Kolonne erforderte hier einige Stunden. — HOLMES, CASSIDY, MANLY und HARTZLER entfernen Gasbläschen durch Klopfen.

Nach unseren Erfahrungen erzielt man durch die Einfüllung einer Suspension tatsächlich eine gleichmäßigere Schichtung von Farbstoffzonen, man muß aber, namentlich wenn ein Glasrohr Calciumcarbonat oder Kalk enthält, den Nachteil in Kauf nehmen, daß die Säule beim Auspressen durchlaufende Risse längs der Zylinderachse erhalten kann.

In geeigneten Fällen haben wir, falls das Einfüllen dringend war, dasselbe so ausgeführt, daß unter stetigem *Saugen* trockenes $CaCO_3$ oder $Ca(OH)_2$ portionsweise in das Rohr gebracht und rasch gestampft wurde. Es läßt sich auch auf diesem Wege schön waagerechte Lagerung erzielen, bei der weiteren Verarbeitung darf jedoch die Füllmasse nicht ausgepreßt werden, da sie in mehrere lange, von der Rohrmündung an nach auswärts gebogene Stücke zerfällt. Dem Abräumen des Rohrinhaltes mit dem Spatel oder der Bereitung eines „flüssigen" Chromatogramms (S. 65) steht natürlich nichts im Wege.

Füllt man getrennte Schichten von *zwei* Adsorptionsmitteln in ein gemeinsames Rohr, so stampfe man die untere Lage, wie gewöhnlich, fest, wickle dann das Holzpistill in ein reines Leinwandtuch und setze das Schlagen noch einige Zeit fort, während die Saugpumpe läuft. Sodann wird die Glaswand sehr sorgfältig von kleinen Staubteilen (herrührend von der Füllmasse) befreit und erst dann mit dem Einstampfen des zweiten Adsorptionsmittels begonnen. Versäumt man diese Vorsichtsmaßregel, so erleidet das Chromatogramm an der Berührungsfläche der beiden Säulen unter Umständen eine empfindliche Störung.

Einführen der Lösung.

Wenn das Rohr vorbereitet ist (s. oben), läßt man die Pumpe weiterlaufen und gießt den ersten Flüssigkeitsanteil ohne Verzug so auf, daß die gesamte Oberfläche möglichst gleichzeitig benetzt und bedeckt werde. Dies geschieht ohne besondere Vorrichtung, man kann aber auch einen Tropftrichter oder sonstige, selbsttätig wirkende Reguliermittel gebrauchen. Beispiele hierzu bringt S. 51 bis 52 wie auch für das Arbeiten bei Luftausschluß. Es ist sehr wichtig, daß die obere Grenzfläche des Pulverzylinders *ständig mit*

Flüssigkeit bedeckt bleibe, von der Einführung des ersten Lösungsanteiles bis zum Abschluß des Entwickelns. Achtet man hierauf nicht, so wird unter Umständen die partiell ausgetrocknete Säule schrumpfen. Gießt man dann wieder Flüssigkeit auf, so sickert dieselbe nicht mehr gleichmäßig durch den gesamten Querschnitt, sondern ein Teil davon eilt voraus, entlang der Glaswand. Deshalb darf die flüssige Phase aus dem ungefüllten Rohrteil erst verschwinden, wenn bereits das Auspressen vorgenommen werden soll.

Kommt eine soeben eingestampfte, noch trockene Adsorptionssäule plötzlich mit einer Flüssigkeit in Berührung, so ergeben sich bei manchen Materialien zwei Übelstände: 1. werden von der oberen Grenzfläche feine Teilchen aufgewirbelt und 2. können kleine Risse entstehen, wodurch das feste Gefüge gestört wird. Man schützt die Säule durch Auflegen eines runden Filtrierpapierstückes; eventuell wird dieses kurz vor dem Versuch mit dem Lösungsmittel befeuchtet. Tswett legte einen, mit dem reinen Solvent durchtränkten Wattebausch auf die Rohrfüllung, welcher einige Zeit dort belassen und erst unmittelbar vor dem Aufgießen der Lösung entfernt wurde. Man erzielt so ein allmähliches Durchdringen der empfindlichen Oberfläche durch die Dämpfe eines organischen Solventen. Manchmal ist es sogar vorteilhaft, zunächst die gesamte Säule mit dem Lösungsmittel unter Saugen anzufeuchten. In zahlreichen anderen Fällen sind alle die erwähnten Maßregeln entbehrlich, besonders wenn ein enges Rohr in Gebrauch steht.

Bei der Chromatographie von Acetylcellulose erwies sich ein Anfeuchten der Säule als ungünstig: S. 159.

Entwickeln zum fertigen Chromatogramm.

Das „Entwickeln" geschieht durch reichliches Aufgießen eines reinen Lösungsmittels, das entweder identisch mit dem angewandten Solvent oder davon verschieden sein kann. Man wählt die letztere Variante, wenn die Elutionskraft gesteigert werden soll, d. h. wenn das Lösungsmittel des eingeführten Substanzgemisches nicht oder nur mit Zeitverlust imstande ist, die Zonen auseinanderzuziehen. Man setze das Entwickeln so lange fort, bis ein optimales Säulenbild erreicht ist, bis also der Eindruck entsteht, daß alle oder diejenigen Schichten, für welche man Inter-

esse hat, sauber herausgeschnitten werden können, ohne daß mehr als höchstens eine Komponente die Säule passiert hat. Im Verlaufe auch der Entwicklung muß die obere Grenzfläche des Adsorptionsmittels *stets* mit Flüssigkeit bedeckt sein. Auch ganz kurze Unterbrechungen sind schädlich.

Über den Gang des Entwickelns orientieren die Abb. 33—35 auf S. 193.

KUHN und WEYGAND haben ein rohes, für die Reinigung bestimmtes Flavin-Präparat in fester Form mit Aluminiumoxyd verrieben und das Gemisch auf eine vorbereitete Al_2O_3-Säule gestampft. Lösen und Entwickeln verliefen hier während der gleichen Operation, nämlich beim Aufgießen von Holzgeist + Xylol.

Die *Beschreibung* eines entwickelten Säulenbildes geschieht zweckmäßig nach dem im Speziellen Teil gebrauchten Schema, wobei von den *links stehenden Zahlen die Zonendicke in Millimetern* angegeben wird (Beispiel: S. 98).

Für die *Beurteilung* des Chromatogramms gelten die folgenden Gesichtspunkte.

Das Aussehen desselben ist weitgehend unabhängig von *Begleitstoffen*, worauf eigentlich die vielseitige Anwendbarkeit der TSWETTschen Methode beruht. Es gibt aber auch Fälle, in denen eine Änderung des normalen Säulenbildes beobachtet wird, wobei die Zonen sich anormal ausbreiten und verwaschen aussehen, ganz als wenn ein Elutionsmittel zugegen wäre. Tatsächlich setzen höhere Konzentrationen mancher Begleiter die Oberflächenaktivität der festen Phase gegenüber der gelösten Substanz stark herab. Die Adsorptionsisotherme verläuft dann ganz anders als diejenige der reinen Verbindung, und zwar so, daß beim Versuch *Elutionsvorgänge* zur Geltung kommen. Man beobachtet dies z. B. bei der Aufteilung von tierischem Lipochrom, wenn es in sehr viel Fett, Cholesterin usw. eingelagert ist. Seltener wird das Festhalten durch die Verunreinigung völlig verhindert, so daß Stoffe durch die Kolonne gehen, die eigentlich fixiert werden müßten (Vgl. hierzu Abb. 42—43, S. 196.)

Das ein- bis viermalige Wiederholen des Adsorptionsversuches führt meist zum Ziel, da die absolute Menge des Begleitstoffes von Säule zu Säule rasch sinkt. Wenn unbedingt nötig, so führe man eine Vorreinigung des Rohauszuges nach irgendeinem anderen Verfahren aus, was namentlich dann erforderlich sein wird, wenn der Quotient gesuchte Substanz/gesamter Stoffinhalt sehr ungünstig liegt.

Besonders reine Präparate zeigen meist größere Adsorptionskraft, ja es kam vor, daß die Elution gerade durch den hohen Reinheitsgrad erschwert oder vereitelt wurde.

Die Vielfältigkeit der möglichen Kombinationen bringt es jedoch mit sich, daß die soeben beschriebenen Verhältnisse auch *umgekehrt* werden können, so daß das Festhalten einer Substanz durch die Anwesenheit eines Begleitstoffes in der Säule begünstigt wird. Von dem Begleiter wird die Kolonne sozusagen „gebeizt" und das „Aufziehen" gefördert. Als Adsorbens ist dann nicht die in das Rohr eingefüllte Masse zu betrachten, sondern das System Füllmasse + Begleiter. Das Fixieren einer dritten Substanz wurde von SCHÖPF und BECKER als „*Secundär-adsorption*" bezeichnet (vgl. auch KOSCHARA 4, 5).

SCHÖPF und BECKER haben gezeigt, daß das Erythropterin (S. 139) aus seiner Rohlösung (wäßriges Pyridin) sehr fest an Aluminiumoxyd adsorbiert wird, obzwar dies mit dem reinen Farbstoff mißlingt. Die Menge des kaum gefärbten Begleiters kann nur gering sein, denn sie reicht zur Festhaltung des Gesamtfarbstoffes nicht aus; ein Teil davon läuft durch die Kolonne und könnte eine gar nicht vorhandene Heterogenität vortäuschen. Der hängengebliebene Pigmentanteil wird von Pyridinwasser langsam eluiert und beim nochmaligen Filtrieren durch eine neue Al_2O_3-Säule nicht mehr adsorbiert. Der Begleiter verbleibt in demselben Bezirk der ersten Säule, wo früher das Erythropterin festgehalten war, und verrät sich durch eine schwach bräunliche Verfärbung oder durch die violettblaue Fluorescenz unter der Quarzlampe.

Das noch ausstehende Studium von künstlich hervorgerufenen Sekundär-adsorptionen verspricht interessante Ergebnisse.

Schließlich sei vermerkt, daß das Adsorptionsverhalten in wäßriger Lösung auch von *Salzen* beeinflußt werden kann, so daß verschiedene Salzkonzentrationen zu abgestuften Möglichkeiten der Fixierung bzw. der Elution führen (vgl. z. B. KOSCHARA 4, RUGGLI und JENSEN 1 sowie S. 154—155).

Auspressen und Zerschneiden der Säule. Elution der Komponenten.

Damit das *Auspressen* des Adsorptionsmittels leicht und ohne Zerbröckelung gelingt, darf es weder zu feucht noch zu trocken

sein. Nachdem das Entwickeln abgeschlossen wurde, läßt man die Pumpe zunächst weiterlaufen, bis die oben stehende Flüssigkeitsschicht verschwunden ist. Dann wird das Saugen noch kurz fortgesetzt (bei sehr luftempfindlichen Stoffen unter Einleiten von Stickstoff). Oft kommt man zum richtigen Feuchtigkeitsgrad, wenn man, nachdem die letzten Anteile des Lösungsmittels eingesickert sind, die Rohrmündung mit dem flachen Handteller $^1/_4$—$^1/_2$ Minute verschlossen hält, während die Pumpe noch läuft.

Das Auspressen geschieht am besten mit Hilfe des auf S. 58 abgebildeten *Holzpistills*, in waagerechter Stellung des Glasrohres, das unmittelbar über Schreib- oder Glanzpapier gehalten wird. Ist das Ausdrücken erschwert oder unausführbar, so kann man das Füllmaterial mit einem Spatel abräumen, was im großen Versuchsmaßstab stets erforderlich ist (S. 56). Meist genügt es, das Adsorptionsrohr vom Apparat zu entfernen, worauf man es umdreht und, mit der Mündung nach unten, mehrere Male sanft aus 1 cm Höhe auf die mit einem Tuch bedeckte Tischplatte fallen läßt. Die Füllung lockert sich, die Säule wandert langsam der Öffnung zu und wird mit dem Pistill ausgepreßt. Man kann übrigens einzelne Säulenbezirke mit Hilfe von runden Leinwandstückchen von vornherein abgrenzen.

Zum *Zerschneiden* dient ein Skalpell. Die Aufteilung wird vorsichtig durchgeführt, also die Säule nicht etwa schematisch, rechtwinklig zur Längsachse zerteilt. Zunächst entfernt man Stücke von unbeladenen Kolonnenteilen, nimmt dann einzelne größere Bezirke in die linke Hand und schabt mit der rechten, in einem spitzen Winkel zur Achse, die weißen Lagen sowie etwaige geringfügige Nebenzonen vorsichtig ab. Dies ist erforderlich, damit auch verbogene oder verzerrte Schichten sauber herausgeholt werden können. In komplizierten Fällen leistet man eine Art Bildhauerarbeit.

Die einzelnen, homogenen Säulenteile werden mit dem Skalpell grob zerbröckelt, sofort in das bereit stehende *Eluens* geworfen und umgeschwenkt. Das Herauslösen erfolgt meist mit großer Geschwindigkeit. Es muß nur ausnahmsweise erwärmt werden. Die Suspension wird filtriert (vorteilhaft sind Glasnutschen) und nachgewaschen.

Die *Kontrolle* der Homogenität erfolgt am besten wieder chromatographisch.

Für die weitere Untersuchung können keine allgemein geltenden Regeln gegeben werden, da ja alle physikalischen, chemischen und physiologischen Methoden zur Verfügung stehen, der Eigenart des betreffenden Körpers gemäß. Ähnliches gilt für die Isolierung.

RUGGLI und JENSEN (1) haben bei der Chromatographie von gewissen wasserlöslichen Teerfarbstoffen ein originelles Verfahren angewandt. Jedes Teileluat wurde unmittelbar auf merzerisierte Baumwolle *aufgefärbt*, von dort mit kochendem Wasser wieder abgezogen und erst dann als Pulver isoliert. Zur Selektivität der Adsorptionssäule gesellte sich hier das auswählende Festhalten von Pigment durch die Faser.

Flüssiges Chromatogramm.

Außer dem vorangehend beschriebenen Gang des Adsorptionsversuches wird recht häufig noch eine andere Arbeitsweise befolgt, welche bereits S. 50 erwähnt wurde und dadurch gekennzeichnet ist, daß die Säule weder aus dem Glasrohr gepreßt, noch zerschnitten wird. Vielmehr trachtet man, den gesamten adsorbierten Stoffinhalt (oder Teile davon) durch die Kolonne zu treiben und *fängt die einzelnen Filtratfraktionen durch Wechseln der Vorlage gesondert auf*. So ergibt sich ein gleichfalls bequemer Arbeitsgang.

Je nach der Adsorptionskraft kommt das obige Prinzip in verschiedenen Ausführungsformen zur Geltung. Beispielsweise bildet man zunächst ein normales Chromatogramm aus, welches dann so energisch entwickelt wird, daß die Komponenten nacheinander in das Filtrat wandern. Man erzielt dies entweder mit Hilfe einer einzigen Elutionsflüssigkeit oder werden immer stärker wirkende Eluenten nacheinander aufgegossen; jedes entfernt gewisse Stoffarten aus der Säule. Hätte man für jede Schicht ein streng auswählend wirkendes Elutionsmittel zur Verfügung, so wären ideale Voraussetzungen für die beschriebene Art des Versuches gegeben.

Im Falle einer stark verunreinigten Rohlösung muß man unter Umständen zwangsweise ein „flüssiges" Chromatogramm bereiten, weil ein stabil verankertes Säulenbild überhaupt nicht zustande kommt. Man beobachtet dann, von dem Zeitpunkte des ersten Aufgusses bis zur Beendigung der Adsorptionsanalyse, ein stetiges Durchlaufen von gelöster Substanz. Entwickelt wird überhaupt

nicht, sondern man fängt die abwärtswandernden Zonen einzeln auf. Ähnliche Verhältnisse lassen sich planmäßig hervorrufen, falls ein für das Festhalten des gelösten Materials zu schwach wirkendes Adsorptionsmittel gewählt wurde.

Freilich genügt die angegebene Ausführungsform zur Trennung von eng aneinander liegenden, dünnen Scheiben keineswegs, namentlich wenn sie sehr ähnliche Stoffe enthalten; bereits geschiedene Komponenten vereinigen sich im Filtrat. Dies kann auch bei gut ausgebildeten Chromatogrammen geschehen und die bereits durchgeführte Aufteilung verderben, falls der Entwickler allzu stark eluierend wirkt. Dann werden nämlich die in den oberen Bezirken der Säule festgehaltenen Stoffanteile rasch herausgelöst, nach unten gespült und mit dort befindlichen anderen Fraktionen wieder vermengt, noch bevor die letzteren die Säule verlassen konnten. Geschieht dies im Falle farbloser Materialien, in dem man die Vorgänge nicht unmittelbar beobachten kann, so kann Untrennbarkeit vorgetäuscht werden, besonders wenn einzelne Schichten des Chromatogramms stark verbogen waren.

Trotz dieser Einschränkungen bildet das „flüssige" Chromatogramm ein unentbehrliches Hilfsmittel zur Aufarbeitung gewisser Stoffgemenge. Die gewonnenen Filtratanteile lassen sich mitunter der „normalen" Chromatographie unterziehen.

Adsorption und Elution in wäßriger Lösung. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration.

Es ist namentlich aus den klassischen Enzym-Forschungen von Willstätter und seiner Schule bekannt, daß die Adsorption von organischem Material an eine anorganisch zusammengesetzte feste Phase, aus wäßriger Lösung, von der *Wasserstoffionenkonzentration* beeinflußt und geleitet wird. Verhältnismäßig kleine Verschiebungen im p_H können gewaltige Effekte hervorrufen und führen beispielsweise zum Herauslösen des Adsorbats. Ähnliche Vorgänge kommen an der Oberfläche eines jeden Körnchens zur Geltung und sind von der äußeren Form der adsorbierenden Gesamtmasse weitgehend unabhängig. Sie spielen demnach auch in die Tswettsche Versuchstechnik hinein.

Dies bedeutet, daß man sehr oft unter Anwendung von *Puffer*-Gemischen arbeiten wird.

Es ist das Verdienst von KOSCHARA (4,5), die einschlägigen Verhältnisse für bestimmte Fälle systematisch untersucht und dargelegt zu haben. Aus seinen, namentlich an *Bleicherden* (S. 43) gesammelten Erfahrungen sei hier folgendes mitgeteilt.

Man kann in wäßriger Lösung, unter Verwendung von Bleicherde, in einem breiten Reaktionsbereich arbeiten, nämlich beginnend von 5 n-Mineralsäure, bis zu $p_H = 11$. Ein stärkeres Alkali fällt Hydroxyle aus, welche das Filter verstopfen. Die Elution geschieht meist in der intakten Säule, einfach durch Senken oder Erhöhen der Wasserstoffionenkonzentration. So wurde z. B. bei $p_H = 7{,}6$ adsorbiert, bei 8,3 nachgewaschen und bei 9,2 entwickelt. Es kam vor, daß die Reihenfolge zweier Zonen bereits durch eine Verschiebung des p_H um 0,3 Einheiten vertauscht wurde. Oft bieten diese Verhältnisse gute Vorbedingungen für die Erzeugung eines „flüssigen“ Chromatogramms (S. 65).

Als *Puffer* haben sich Phosphat- und Boratlösungen nach SÖRENSEN bewährt; die Verwendung von Ammonchlorid + Ammoniakpuffer ist ungünstiger. Wäßrige Alkaliacetate sind auf Bleicherden zu vermeiden. Gebraucht man Aluminiumhydroxyd, so wird die Pufferlösung zweckmäßig mit Holzgeist verdünnt.

Falls die Alkalinität des Puffers zur *Elution* nicht ausreicht, verwende man eine 2prozentige oder stärkere wäßrige Pyridinlösung, eventuell eine noch wirkungsvollere Mischung von Pyridin und Säuren. Die Eluierbarkeit hängt natürlich nicht nur vom Milieu, sondern auch von der chemischen Zusammensetzung des Adsorptionsmittels ab, z. B. erforderte ein Farbstoff zur Elution aus Bleicherde XXF $p_H = 8{,}3$, während er von einer Frankonit-KL-Säule erst bei 9,2 abgelöst werden konnte.

Man versuche die Anwendung von *Bleicherde* zuerst in neutraler oder saurer Lösung. Eine „neutrale Adsorption“ läßt sich indessen nur erreichen, wenn auch das Adsorbens wirklich neutral reagiert, wenn es also fabrikatorisch nicht mit Säure vorbehandelt wurde (vgl. S. 43). Die Kombination neutrale Erde + saure Lösung ist in der Adsorptionssäule ungünstig, da durch das Entweichen von Kohlendioxyd Risse entstehen können. Auf *Frankonit* sind auch saure Lösungen verwendbar, obzwar es meist genügt, wenn eine neutrale Flüssigkeit zu dieser sauren Erde gelangt.

Die Frankonit-KL-Säule sowie das Adsorbat müssen ausgiebig *mit dem Aufnahmepuffer gewaschen* werden, denn nur dann

ist die Kolonne für eine glatt verlaufende Entwicklung richtig vorbereitet. Durch ein solches Waschen wird allerdings der Farbstoff meist gar nicht abwärtsgetrieben und nicht eluiert, die Säule verändert sich jedoch derart, daß lokale, „sauer adsorbierende" Stellen verschwinden. Hat man dagegen die Säule ungenügend mit dem Aufnahmepuffer durchspült, so löst zwar das nachfolgend angewandte Eluens den Farbstoff ab und treibt ihn in tiefer liegende Bezirke, doch stockt die wandernde Schicht plötzlich und bezeichnet damit jene Stelle, bis zu welcher das vorbereitende Waschen wirksam war und unterhalb der noch „saure" Adsorption besteht.

Als Apparat dienten zylindrische Nutschen, mit der Wasserwaage ausgerichtet. Man saugt erst ganz schwach (30—50 cm Wasserdruck) und läßt die Pumpe erst später kräftig laufen.

Einschlägige Arbeitsvorschriften. Isolierung von Lyochromen (S. 136) sowie von Uropterin (S. 143) aus Harn. — Chromatographie in wäßriger Lösung, *ohne* Anwendung von Puffern: Anthocyane, S. 145.

Besondere Methoden zur Chromatographie farbloser Substanzen.

Die auf Grund der Verschiedenheit von Adsorptionsaffinitäten sich abspielende Stoffzerlegung steht mit der *Farbe* in keinem zwangsweisen Zusammenhang. Vielmehr ist die fraktionierte Adsorption von Pigmenten der für den Experimentator bequemste Spezialfall einer allgemeineren Erscheinung, in welchem der Versuchsablauf mit dem Auge verfolgt werden kann. In zahllosen anderen Fällen erfolgt gleichfalls eine Schichtung, ohne daß dies auffallend zutage treten würde. Schon TSWETT (1) spricht treffend von einem *unsichtbaren Chromatogramm.*

Vor kurzem empfahl KOSCHARA (4), die historische Bezeichnung „Chromatographie" bei farblosen Materialien fallen zu lassen, zugunsten von „Adsorptionsanalyse". Wir schließen uns diesem Vorschlag nicht an, da das Wesentlichste der TSWETTschen Idee, nämlich das Durchströmen des Adsorbens in *einer* Richtung, auch bei Versuchen mit weißen Substanzen in Geltung bleibt.

Derzeit sind die nachfolgend aufgezählten Methoden zur Chromatographie von farblosem bzw. schwachgefärbtem Material in Gebrauch. Man ist dabei bestrebt, ein unmittelbares Beobachten zu ermöglichen, also irgendwie Farbe oder Leuchterschei-

nungen hervorzurufen. Gelingt dies, so werden jene Aufteilungsverfahren brauchbar, welche sich auf dem Gebiet der Pigmente bewährt haben.

1. Das empirische Verfahren.
2. Markierung einer farblosen Zone mit einem Indicator.
3. Chromatographie nach chemischer Umwandlung des farblosen Gemisches in gefärbte Stoffe.
4. Sichtbarmachung des Chromatogramms in ultraviolettem Licht.
5. Sichtbarmachung des Chromatogramms mittels Farbreaktionen.

1. Das empirische Verfahren

besteht einfach darin, daß man das Chromatogramm, obzwar keine sichtbaren Wegweiser vorhanden sind, in mehrere Bezirke aufteilt und die Eluate einzeln untersucht. Nachdem so die Verhältnisse geklärt wurden, wird man bei ähnlichen, mit demselben Material ausgeführten Versuchen planmäßig vorgehen können. Dasselbe gilt natürlich auch für Filtrate, die sich anteilsweise auffangen und prüfen lassen.

2. Markierung einer farblosen Zone mit einem Indicator.

Bereits TSWETT (1) empfahl, der aufzuteilenden farblosen Lösung *ein Pigment beizumengen*, dessen Platz in der Säule, relativ zu einem weißen Inhaltsstoff, genau bekannt ist. Durch den Farbstoff wäre dann auch die Lage einer unsichtbaren Zone markiert, ebenso ihr Abwärtswandern während der Entwicklung zum fertigen Chromatogramm. Das Verfahren ist wirklich ausführbar, eine allgemeine Methode bietet sie aber nicht (vgl. auch WINTERSTEIN und STEIN 1). Jedenfalls muß das Adsorptionsverhalten genau studiert und die Vorschrift sorgfältig festgelegt werden.

In der neuen Untersuchung von BROCKMANN (3) findet man ein schönes Beispiel für diese Arbeitstechnik. Zwecks Isolierung des Vitamins D_3 aus Thunfisch-Leberöl (Einzelheiten S. 182) wurden zahlreiche Farbstoffe auf ihre Eignung als Säulenindicator geprüft, und zwar durch Vergleich mit Vitamin D_2 in bezug auf die Adsorptionsisotherme sowie auf das chromatographische Verhalten. Hierbei fand auch der Einfluß von physiologisch unwirksamen Begleitern, welche in Leberölen vorzukommen

pflegen, die gebührende Berücksichtigung. Am besten hat sich das „Indicatorrot 33“ bewährt: die roten Zonen des Chromatogramms waren gleichzeitig die vitaminreichsten. Erst wenn der Farbstoff in einer schmalen Schicht sich angesammelt hatte, schließt man das Entwickeln ab und zerschneidet die Säule.

In günstigen Ausnahmefällen wird der Indicator von der Natur selbst dargeboten; so befindet sich im Giftsekret der Kröte ein Pigment, das genau wie das farblose Hauptgift Bufotalin adsorbiert wird (WIELAND, HESSE und HÜTTEL; s. S. 170, vgl. auch TSCHESCHE und OFFE, S. 171).

3. Chromatographie nach chemischer Umwandlung des farblosen Gemisches in gefärbte Stoffe.

Das Prinzip dieses Kunstgriffes besteht darin, den Substanzen, vor Ausführung der Adsorptionsanalyse, ein später leicht abspaltbares Chromophor anzuhängen, wodurch die gestellte Aufgabe auf die Zerlegung von Farbstoffen zurückgeführt wird. Diese Arbeitsweise stammt von STRAIN (4) und diente zunächst zur Trennung von gewissen Carbonylverbindungen. Man kondensiert dieselben mit 2,4-Dinitro-phenylhydrazin und nimmt die Aufteilung des Hydrazongemisches auf Talcum, Fasertonerde, Aluminiumoxyd, Aluminiumphosphat, tert. Magnesiumphosphat oder Fullererde vor. (Magnesiumoxyd oder andere basische Adsorptionsmittel wirken zersetzend.) Das sehr nützliche Verfahren erfordert einen verhältnismäßig bedeutenden Zeitaufwand.

Beispiele. a) Eine Petrolätherlösung der Dinitro-phenylhydrazone von *β-Jonon* und *Campher* wird auf Talcum verarbeitet: oben bleibt das Jonon-, darunter das Campherderivat hängen.

b) Trennung von *Geronsäure-* und *Lävulinsäure*-dinitrophenylhydrazon, in Benzin, auf Talcum. Oben: das Hydrazon der Lävulinsäure $CH_3 \cdot CO(CH_2)_2COOH$, darunter dasjenige der Geronsäure $HOOC \cdot C(CH_3)_2CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CO \cdot CH_3$.

Die mit Sprit eluierten Dinitro-phenylhydrazone lassen sich in wäßriger, wäßrig-saurer oder in Eisessiglösung mittels einer Dicarbonylverbindung wieder spalten, z. B. mit Glyoxal, Methylglyoxal oder Diacetyl.

c) Das Verfahren wurde auch auf *Pikrate* von Tetraalkyl-ammoniumhydroxyden ausgedehnt.

Ein prinzipiell ähnlicher Weg wurde von LEDERER bei der Trennung von *Phenolen* befolgt (Privatmitteilung): Man versetzt

die wäßrige Lösung mit Ferrichlorid und chromatographiert die tiefgefärbte Flüssigkeit auf Al_2O_3. Phenol, Resorcin, Brenzcatechin und Phloroglucin lassen sich gut unterscheiden.

4. Sichtbarmachung des Chromatogramms in ultraviolettem Licht.

Dieses besonders fruchtbare und entwicklungsfähige Verfahren gründet sich darauf, daß zahlreiche *farblose Substanzen im Licht der Quarzlampe lebhaft fluorescieren*. Die Erscheinung wurde gleichzeitig von WINTERSTEIN und SCHÖN (1) bzw. von KARRER und SCHÖPP (2) auf dem Gebiet der TSWETTschen Arbeitstechnik nutzbar gemacht. Die letztgenannten Forscher führten die Bezeichnung „*Ultra-chromatographie*" ein, GRASSMANN und LANG sprechen von einem „*Fluorescenz-chromatogramm*".

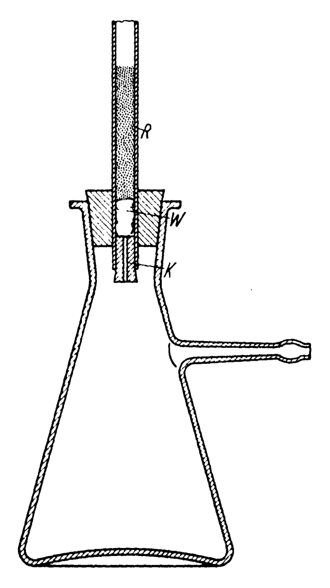


Abb. 24. Adsorptionsrohr aus Quarz (montiert).

Durch die neue Arbeitsweise wird es nicht nur ermöglicht, den Platz fluorescierender Substanzen in der Säule zu lokalisieren und dieselben von Stoffen zu trennen, welche mittels einer Ultraviolettbestrahlung nicht anregbar sind, sondern man beobachtet im günstigen Falle verschiedenfarbiges und ungleich starkes Leuchten der einzelnen Bezirke (Blaufluorescenz ist meist untypisch). Das richtige Zerschneiden der Säule bereitet dann keine Schwierigkeit.

Die theoretisch günstigsten Versuchsbedingungen sind bei der Verwendung eines Quarzrohres gegeben, z. B. in der einfachen Anordnung der Abb. 24 (R = Rohr, 16 cm lang; w = Watte; K = Kork; nach GRASSMANN). KARRER und SCHÖPP (2) empfehlen ein viereckiges Rohr mit planparallelen Wänden für den Kleinversuch. Der Gebrauch des immerhin kostspieligen Quarzes, aus welchem geschliffene Apparaturen nur umständlich herzustellen sind, ist aber nach unseren Erfahrungen gar nicht erforderlich, wenn die Fluorescenz einigermaßen stark ist, sondern man

kommt mit Glas aus, am besten mit weichem Geräteglas (Schott und Gen., Jena). In anderen Fällen wird man die Säule erst nach dem Auspressen in das Uviollicht bringen und so die apparative Schwierigkeit umgehen.

Als *Lichtquelle* für die im Dunkelzimmer vorzunehmende Bestrahlung eignet sich jede gute Lampe („Analysen-Quarzlampe"). In unserem Laboratorium hat sich die neue, *tragbare* Konstruktion der Quarzlampen-Ges. m. b. H. (Hanau) sehr gut bewährt



Abb. 25. Aufteilung des Chromatogrammes unter der tragbaren Quarzlampe.

(Abb. 25). Die Gefäßhülle besteht aus Dunkel-uviolglas, von welchem nur das um 366 $\mu\mu$ liegende Spektralgebiet durchgelassen wird. So entfällt der Gebrauch eines Lichtfilters. Der Innenraum der geräumigen Halbkugel (Durchmesser 36 cm) kann voll ausgenutzt werden. Man drückt die Säule auf schwarzes Papier aus und zerschneidet sie unter der Glocke, während der Experimentator durch eines der Gucklöcher blickt (Schutzbrille unnötig).

Sogar verbogene *Chromatogramme* lassen sich mit Hilfe eines Skalpells gut verarbeiten. Öfters sehen die „leeren" Säulenteile dunkelbraun oder schwarz aus, so, daß die festgehaltene Substanz sich leuchtend abhebt. Allerdings kann auch eine leere Kolonne fluorescieren, je nach ihrer chemischen Beschaffenheit.

Manchmal beeinflußt die Anwesenheit einer Substanz das Leuchten einer anderen in überraschend hohem Maße. So wird

z. B. nach WINTERSTEIN, SCHÖN und VETTER die Fluorescenz des Anthracens schon durch einen Zusatz von $^{1}/_{30000}$ % Naphtacen vollständig, durch einen solchen von $^{1}/_{100000}$ % fast ganz gelöscht.

Arbeitet man in *wäßrigen* oder wasserhaltigen Medien, so ist zu beachten, daß Stärke und Farbe der Leuchterscheinung weitgehend *vom herrschenden* p_H *abhängen* können. Das Verhalten des Fluorescenzlichtes bei einer planmäßigen Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration kann für die betreffende Substanz typisch sein und dieselbe von sonst ähnlichen Begleitern unterscheiden. Ein schönes Beispiel bietet der von KOSCHARA (5) studierte Farbstoff Uropterin (S. 143), dessen Verhalten in Tabelle 9 wiedergegeben wird.

Tabelle 9. Fluorescenz des Uropterins, in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration.

Milieu	Farbe	Fluorescenz in ultraviolettem Licht
Starke Mineralsäure .	farblos	rot
normal-Mineralsäure .	farblos	gelöscht
Essigsäure	gelb	gelöscht (mattgelb)
$p_H=4$	grünblau	gelbgrün (schwach)
$p_H=7$ bis 11	grünblau	himmelblau
Sodalösung	blaugrün	grün
Natronlauge	gelb	gelöscht (moosgrün)

Es sei schließlich bemerkt, daß man das Fluorescenzlicht auch spektroskopisch kennzeichnen kann.

5. Sichtbarmachung des Chromatogramms mittels Farbreaktionen.

Es gibt in der Literatur mehrere Beispiele dafür, daß die für das Auge unsichtbare Schichtung des Materials mit Hilfe einer Farbreaktion festgestellt wird. Dies kann entweder nach dem mehr oder weniger empirisch vorgenommenen Zerschneiden des Adsorptionsmittels, also in den Teileluaten geschehen und fällt dann, streng genommen, außerhalb der chromatographischen Methodik, oder aber während des eigentlichen Versuches, am besten in der Säule selbst.

Für die erstere Arbeitsweise stammt ein frühes Beispiel von WINTERSTEIN und STEIN (1) und betrifft die Scheidung von

Cholesterin und Ergosterin bzw. die Anreicherung des letzteren (vgl. S. 183). Das Cholesterin ging größtenteils in das Filtrat, die Säule wurde in vier Teile zerschnitten und mit Äther + Methanol eluiert. Die ROSENHEIM-TORTELLI-JAFFÉsche Farbreaktion fiel nur mit dem Stoffinhalt der obersten Schicht stark positiv aus.

KÖGL, HAAGEN-SMIT und ERXLEBEN haben ihr Hetero-auxin-Präparat aus Benzol auf Calciumcarbonat chromatographiert und mit Benzol + Alkohol entwickelt (Näheres S. 188). Ein Teil der Substanz passierte das Adsorbens und gab keine Reaktion mit Eisenchlorid-Salzsäure. Nun wurde die Säule in sechs Teile zerschnitten, jeder mit Sprit eluiert und der Trockenrückstand der Auszüge auf die genannte Farbreaktion untersucht, welche hauptsächlich mit dem 3. und 4. Anteil positiv verlief.

Die Anzahl derartiger Vorschriften ließe sich vermehren. Wir gehen indessen zu weiteren Verfahren über, bei welchen das Zerschneiden der Kolonne entweder ganz wegbleibt oder erst *nach* Vornahme einer Farbreaktion ausgeführt wird.

RUGGLI und JENSEN (2) gelang die Scheidung von Naphtolsulfosäuren wie folgt: Das unsichtbare Chromatogramm (Aluminiumoxyd, wäßrige Lösung) wird mit Wasser entwickelt, bis die einzelnen Zonen nacheinander in das Filtrat gelangen. Man fängt sie in besonderen Vorlagen auf, die mit einer Diazolösung beschickt sind (diazotiertes Echtrot JTR-Base), und erhält z. B. mit Natriumsalzen der 1-Naphtol-4-sulfosäure einen roten, mit der 2-Naphtol-4-säure einen violetten Farbstoff. In einer weiteren Versuchsreihe wurde die herausgepreßte Säule mit der Diazolösung übergossen, wobei ihre obere Hälfte violett, die untere sich rot anfärbte.

Die Aufgabe ist in manchen Fällen auch nach der folgenden *Pinselmethode* lösbar, und zwar fast ohne Verlust an Substanz.

Nach Erzeugung des unsichtbaren Chromatogramms preßt man die Säule aus dem Rohr und zieht mit einem Pinsel, der in ein passend gewähltes Reagens getaucht worden ist, einen dünnen Strich auf dem Adsorbens, parallel zur ganzen Längsachse. Die Linie wird nur dort scharf hervortreten, wo sie die Schicht einer Substanz passiert, welche mit ihr zur Pigmentbildung befähigt ist. Im Falle farbiger Reagenzien, z. B. Permanganat, beobachtet man einen Umschlag der Nuance. Nachdem die Lage der betreffenden Schicht aufgefunden und bezeichnet wurde, schabt man mit

einem Messer die vom Reagens befeuchtete dünne Lage des Adsorbens ab und zerschneidet die Säule wie gewöhnlich (ZECHMEISTER, CHOLNOKY und UJHELYI; Abb. 45, S. 197).

Beispiele. a) Trennung von *Benzidin* und *α-Naphtylamin*. Je 30 mg Substanz wurden in 20 cm^3 Benzol + 50 cm^3 leichtem Benzin gelöst und auf Aluminiumoxyd (nach BROCKMANN) gegossen. Als Reagens dient eine wäßrige Lösung von Sulfanilsäure + Natriumnitrit, welche in einem oberen Säulenteil grüne Farbe hervorruft (Benzidin). Das Naphtylamin befindet sich tiefer und gibt einen roten Farbstoff. Wird statt dem Diazoreagens eine Lösung von Bleiperoxyd in 30proz. Essigsäure angewandt, so sieht man oben einen blauen, darunter einen grünen Abschnitt des Striches.

b) Die Trennung von α- und *β-Naphtol* (in Benzol + Benzin, auf Al_2O_3) gelingt leicht mit der Diazolösung. Man erhält eine leuchtend orange Färbung (β) und tieferliegend eine violette (α).

c) Auch Permanganat ist oft verwendbar und diente z. B. zur Lokalisierung von *ω-Nitrostyrol* (Benzin, $Ca(OH)_2$) in Gegenwart von gesättigten Substanzen.

d) Die Lage mancher *Aldehyde* läßt sich mit Hilfe von Fuchsinschwefligsäure ermitteln (Rotfärbung), z. B. diejenige von m-Nitrobenzaldehyd, in Benzol + Benzin, auf $Ca(OH)_2$.

e) Löst man *Dimethylglyoxim* in viel warmem Benzol, so bleibt es in der Kalkkolonne oben haften und wird mit Hilfe von Nickelsulfat leicht lokalisiert (Rotfärbung).

f) *Vitamin-A*-Präparate lassen sich in der $Ca(OH)_2$-Säule mittels der CARR-PRICE-Reaktion nachweisen (Pinseln mit $SbCl_3$ in Chloroform, Blaufärbung): Abb. 45, S. 197.

Spezieller Teil.

Drittes Kapitel.

Anwendungen auf natürliche Farbstoffe.

> Es ist eine natürliche Neigung unseres Geistes, allem Gefärbten eine besondere Aufmerksamkeit zu schenken. (*Tswett*)

1. Chlorophyll.

Der Anteil von Tswett an der Anwendung der Adsorptionsanalyse auf das Blattgrün wurde schon S. 2 gewürdigt. Willstätter und Stoll, denen die Isolierung und Analyse der Chlorophylle a und b auf anderem Wege gelungen war, nehmen in ihrem bekannten Werk (dort S. 157) folgend zu jenen Arbeiten Stellung: „.... seine Angaben sind, soweit sie die grünen Komponenten betreffen, in allem Wesentlichen durch unsere Untersuchungen bestätigt worden. Die chromatographische Methode ist bisher nur in sehr kleinem Maßstabe angewandt worden und sie erscheint für präparative Arbeit ungeeignet. Inwieweit es Tswett gelingt, bei der Bildung des Chromatogramms und der Isolierung der Chlorophyllkomponenten aus demselben die Allomerisation des Chlorophylls zu verhüten, ist noch nicht bekannt; nicht die spektroskopische Untersuchung, nur die Prüfung der Phytochlorine und Phytorhodine gibt darüber Aufschluß."

Man sieht, daß das Hauptergebnis von Tswett durchaus der präparativen Kontrolle standhielt. Wie es sich aber später zeigte, waren die Befürchtungen von Willstätter und Stoll in bezug auf die Empfindlichkeit des adsorbierten Grüns teilweise begründet. Die Chlorophylle erleiden, nach Winterstein und Stein (2), in der Calciumcarbonat-, Aluminiumoxyd-, Fasertonerde- und Natriumsulfat-Säule alsbald eine Veränderung, welche durch den Verlust der „Phasenprobe" sich kundgibt. Wendet

man jedoch den (bereits von Tswett gebrauchten) Puderzucker an, der oben das Chlorophyll b (dunkelgrün), in einem tieferliegenden Bezirk das Chlorophyll a (blau) festhält, so ist die Stabilität des Farbstoffes für präparative Bearbeitung hinreichend.

```
H3C—C═══C—CH═CH2                        H3C—C     C—C2H5
    |   |                                    ‖     |
    C   C═══════════════════════════CH——C     C
   /  ⟍ /                                ⟍ /  ⟍
  /    N                                  N     ⟍
HC                       Mg                      CH
  ⟍    N                                  N     //
   ⟍  / ⟍                               // ⟍  //
    C   C ══════════════════════C — C     C
    |   |                        |    |     |
H3C—C═══C—CH2                   HC    C     C—CH3
        |                        | ⟍ / |    |
        CH2                    O═C   C  H   H
        |                        |   ‖
        COO—C20H39            H3C—O  O
```

Chlorophyll a (nach H. Fischer und Mitarb.; s. auch Forschungen von A. Stoll).

```
H3C—C   C—CH═CH2                   O═CH—C——— C—C2H5
        |                                  ‖     ‖
    C   C ═══════════════════════CH     C     C
   /  ⟍ /                                ⟍ /  ⟍
  /    N                                  N     ⟍
HC                       Mg                      CH
  ⟍    N                                  N     //
   ⟍  / ⟍                               // ⟍  //
    C   C═══                       C     C     C
    |   |                          |     |     |
H3C—C   C—CH2                     HC     C     C—CH3
        |                          | ⟍ / |     |
        CH2                      O═C   C  H    H
        |                          |   ‖
        COO—C20H39              H3C—O  O
```

Chlorophyll b (nach H. Fischer und Mitarb.; s. auch Forschungen von A. Stoll).

Nach Winterstein und Stein (2) waren die Chlorophyll-b-Präparate von Willstätter und Stoll noch a-haltig (15—20%), was bei chromatographisch bereiteten Endprodukten nicht der Fall ist. (Nach Stoll und Wiedemann läßt sich der höchste Reinheitsgrad auf anderem Wege gleichfalls erreichen.)

Neuerdings hat sich auch ZSCHEILE mit der Adsorptionsanalyse des Chlorophylls beschäftigt; die Komponenten a und b wurden so dargestellt, daß nach der Ausführung von bekannten Isolierungsmethoden (WILLSTÄTTER und STOLL) noch auf Talcum chromatographiert wurde (Lösungsmittel: Äther + Petroläther; Elution mit Äther). Der Befund von ZSCHEILE, daß außer den beiden Komponenten des Chlorophylls noch ein „Chlorophyll c" existiere, konnte von WINTERSTEIN und SCHÖN (1) nicht bestätigt werden. Wendet man nämlich Puderzucker als Säulenmaterial an, so erscheint die c-Zone nicht. Die letztere dürfte durch einen im Talk sich abspielenden Zersetzungsvorgang gebildet worden sein.

Zur Bestimmung des Mengenverhältnisses

von Chlorophyll a und b dient die chromatographische Trennung mit nachfolgender Colorimetrie. Daß ein einfacher Vergleich der Zonenbreiten unzulässig ist, wurde schon von TSWETT (1, dort S. 123—125) betont. Nach WINTERSTEIN und STEIN (2) genügen für die Ausführung der Analyse 1 bis 2 Blätter:

Die Blätter werden mit einem dünnen Draht umwunden und (z. B. in flüssigem N_2) ausgefroren. Man zerreibt möglichst rasch mit einem großen Pistill, rührt mit 25 cm³ Benzin (Siedep. 70°) + Benzol (9 : 1) unter Zusatz von 8 cm³ Methanol an, nutscht und wäscht mit ebensoviel Lösungsmittelgemisch (Rückstand weiß). Durch vorsichtigen Wasserzusatz (nicht schütteln!) wird das Methanol im Scheidetrichter quantitativ weggewaschen und die Pigmentlösung durch ein trockenes Faltenfilter gegossen.

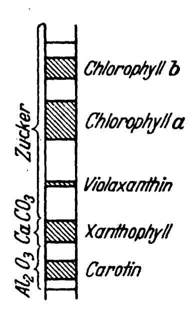


Abb. 26. Chromatogramm des Blattauszuges[1], nach WINTERSTEIN.

Nun folgt die Adsorption auf Puderzucker (Rohrmaße 10 × 1 cm). Ist die Lösung fast ganz eingesickert, so wird, je nach der Geschwindigkeit des Abwärtswanderns der Zonen, mit Benzin-Benzol-Gemischen 4 : 1, 9 : 1 oder 19 : 1 nachgespült. Die benzolreicheren Solventen entwickeln stärker; ein zu rasches Entwickeln (breite, verwaschene Zonen) wird durch Aufgießen von Petroläther (Siedep. 30—50°) abgebremst. Das Carotin läuft bald durch und kann im Filtrat colorimetriert werden. Xanthophyll wird stärker fixiert, doch eilt es dem Chlorophyll a weit voraus.

[1] Die Identität des „Violaxanthins" ist noch unsicher.

Um es festhalten zu können, füllt man eventuell in den unteren Teil des Rohres scharf getrocknetes $CaCO_3$ ein; das Carotin läßt sich, wenn nötig, mit Hilfe von Al_2O_3 abfangen: Abb. 26, S. 78.

Benzin und Benzol werden mit Petroläther aus der Säule gedrängt und das Chromatogramm im CO_2-Strom trocken gesaugt. Auspressen und Zerschneiden, wie gewöhnlich. Man eluiert mit methanolhaltigem Äther, wäscht den Alkohol weg, bringt die Eluate auf je 15 cm^3 und mißt im Stufenphotometer (Filter S 43), nach vorheriger Eichung mit reinen Chlorophyll-a- und -b-Lösungen. Die Chlorophyll-b-haltige Lösung wird spektroskopisch auf etwaige Spuren von a geprüft, welche dann bei der Berechnung vom b-Gehalt abzuziehen sind. Z. B. gefunden b : a = 1 : 2,96, in jungem Klee.

Isolierung von Chlorophyll a und b aus Rohchlorophyll.

(Winterstein und Stein 2.)

Die nachstehende Vorschrift bezieht sich auf die Scheidung von 3 g Chlorophyllgemisch (60% a + 40% b). Zunächst gewinnt man im besten Falle 0,7 g reines a und 1,3 g Chlorophyll b, das etwa 10% a enthält. Aus dem letztgenannten Präparat wird dann die Komponente a in einem besonderen Adsorptionsversuch entfernt.

Die Füllung des Apparates mit Puderzucker geschieht nach S. 56. 3 g Rohchlorophyll werden in 100 cm^3 Benzol (thiophenfrei, pro anal. Merck) gelöst und mit Benzin (Siedep. 70°) auf 1500 cm^3 verdünnt. Nachdem 200 cm^3 eines Benzin-Benzol-Gemisches (14 : 1) in die Säule gebracht wurden, wird das Chlorophyll eingeführt. Ist die Lösung fast eingesaugt, so füllt man 150 cm^3 Benzol-Benzin-Gemisch nach; dann wird mit Benzin etwas weiter entwickelt, schließlich die Säule mit Petroläther nachgewaschen und möglichst trocken gesaugt (Dauer 1—1½ Stunden).

Man zerlegt die Kolonne durch Abschaufeln in drei Teile: oben Chlorophyll b (90proz.), darunter ein Gemisch a + b, unten *reines a*. Jeder Anteil wird mit 1 l Aceton + Äther (1 : 1, Äther peroxydfrei) verrührt, genutscht und mit dem gleichen Solvent gewaschen, bis der Zucker (fast) weiß erscheint. Das Aceton wird im Scheidetrichter durch vorsichtiges Waschen mit Wasser entfernt (nicht schütteln!). Man filtriert die ätherische Lösung durch

ein mit wenig Natriumsulfat beschicktes Faltenfilter und dampft sie im Vakuum bei 25° vollständig ein. Der Rückstand wird in wenig Äther aufgenommen, filtriert, im Vakuum auf ein kleines Volumen gebracht und das Chlorophyll mit Petroläther gefällt. Man zentrifugiert nach einiger Zeit, gießt die Lösung ab, löst den Rückstand in wenig Äther, verdampft im Vakuum vollständig und evakuiert den Kolben längere Zeit. Das Chlorophyll läßt sich gut herauskratzen.

Zwecks Reindarstellung von *Chlorophyll b* aus dem 90proz. Material werden 0,2 g in 15 cm^3 Benzol gelöst und mit Benzin auf 150 cm^3 gebracht. Man adsorbiert an Zucker (Rohr 12 × 5,5 cm), wäscht mehrfach mit Benzin + Benzol (14 : 1), schließlich mit Petroläther und saugt trocken. Es wird nur die Hauptzone verarbeitet, und zwar wie oben eluiert usw. Zur weiteren Reinigung werden die Präparate aus 4—5 Adsorptionsversuchen vereinigt, in wenig Äther gelöst und mit Petroläther gefällt. Das Abtrennen des Niederschlages geschieht in der Zentrifuge. Nach 2—3 Umfällungen ist das Chlorophyll b rein.

Die **Trennung von Phäophytin a und b** läßt sich gleichfalls chromatographisch durchführen, wenn auch diese Abbauprodukte von Zucker nicht so stark festgehalten werden als die Chlorophylle selbst. Mischungen wie Zucker + Talcum dürften geeigneter sein.

Auch das **Bakterien-chlorophyll** kann chromatographisch herausgearbeitet werden. GAFFRON (2) hat Thiocystisbakterien in einer Talcum-Säule nacheinander mit Alkohol, Aceton und Äther ausgezogen und die Bildung einer grünen, einer gelben und einer roten Zone beobachtet. Der grüne Pigmentanteil ist Bacteriochlorophyll. Abbauprodukte des letzteren wurden von FISCHER und HASENKAMP (1) studiert (Näheres S. 81).

Auf dem Gebiete der **tierischen Chlorophylle** wurde schon frühzeitig (1916) die TSWETTsche Methode angewandt, und zwar von DHÉRÉ und VEGEZZI (s. auch VEGEZZI), gelegentlich der Untersuchung des Pigments der Weinbergschnecken-leber (Helix pomatia). Bei dem Aufgießen eines Benzinextraktes auf Calciumcarbonat und reichlichem Nachwaschen bilden sich vier Zonen aus;

Oben: gelb, Xanthophylle,
grünlich (Doppelscheibe),
graustichig,
unten: gelb, Carotin, läuft durch.

Die Untersuchung zeigt, daß das von dem Tier aus pflanzlicher Quelle bezogene Pigment angegriffen wurde, indem es unter der Einwirkung von Säuren in Phäophytin a und b (oder in ähnliche Stoffe) überging. Die letzteren Abbauprodukte haben sich in den beiden mittleren Scheiben des Chromatogramms angereichert.

Derivate und Abbauprodukte des Chlorophylls.

Umkehrbare Reduktion. Nach KUHN und WINTERSTEIN (2) lassen sich die Chlorophylle a und b durch Behandlung mit Zinkstaub in Pyridin, unter Zusatz von etwas Essigsäure, in *Leukoverbindungen* überführen. Bei Luftzutritt regeneriert rasch das braune Filtrat unversehrtes Chlorophyll, von welchem die begleitenden Zersetzungsprodukte folgend abgetrennt wurden: Nach Zusatz von Benzin wird das Pyridin ausgewaschen und die Lösung auf Puderzucker chromatographiert (Entwickeln mit Benzin). Bei der Verarbeitung von Chlorophyll a erschienen drei Zonen:

Oben: schmal, schwarz: unbekannte Zersetzungsprodukte,
rein blau: Chlorophyll a (70—80% des Rohpigments),
unten: hellgrau, wahrscheinlich Phäophytin.

Das aus Chlorophyll b bereitete Reaktionsgemisch liefert eine grüngelbe Scheibe im oberen Teil des Rohres.

Gelegentlich analytischer und synthetischer Arbeiten auf diesem Gebiete diente die Chromatographie im Laboratorium von H. FISCHER öfters als Hilfsmittel:

Bacterio-phäophytin. FISCHER und HASENKAMP (1) haben den purpurfarbenen Thiocystis-Bakterienbrei (aus 150 l Kulturlösung) mit Aceton verrieben, 1 Tag stehengelassen und dreimal mit 80proz. Aceton extrahiert. Man gießt die Auszüge in Äther, wäscht mit gut destilliertem Wasser wiederholt aus und schüttelt mit 10proz. HCl durch. Nun wurde die ätherische Lösung auf 20 cm^3 gebracht, das ausgefallene Bacterio-phäophytin abfiltriert und die Mutterlauge auf eine Talcum-Säule gegossen. Dann wurde das oben festgehaltene Pigmentgemisch mit Aceton entwickelt. Es konnte dabei in geringer Menge ein phorbidähnlicher Körper abgetrennt werden (Komponente b?), der von dem niedergeschlagenen Hauptprodukt spektroskopisch abweicht.

Versuchsführung in kleinerem Maßstab: GAFFRON (1).

Versuche mit Phorbiden. a) FISCHER und HASENKAMP (2) konnten ihr *Dihydro-phäophorbid a* in der Talcum-Säule wirk-

sam von Phäophorbid a befreien, das früher Träger der im Original beschriebenen Oxoreaktion war, nun aber im oberen Bezirk der Kolonne hängen blieb. Das Chromatogramm wurde aus einer gesättigten Ätherlösung bereitet, zum Nachwaschen diente Aceton + Äther.

b) Aus frischem Schafkot erhaltene „*Probophorbid*"-Präparate lassen sich nach FISCHER und STADLER in Aceton, auf Talcum chromatographieren. Entwickelt man mit Äther, so erscheinen zwei Farbschichten: in der unteren ist das *Dihydro-pyrophäophorbid a* weitgehend angereichert. Die Uneinheitlichkeit des sog. Probophorbids wurde hier adsorptionsanalytisch bestätigt.

c) Eine chromatographische Reinigung des *Phäophorbid-a-geranylesters* $C_{45}H_{52}O_5N_4$ haben FISCHER und SCHMIDT versucht.

d) Das bei der *Anlagerung von Diazoessigester an Methyl-phäophorbid a* entstehende Reaktionsgemisch kann nach entsprechender Aufarbeitung gleichfalls chromatographiert werden (FISCHER und MEDICK). Die Substanz wird in Äther-Aceton-Lösung, die bis zur eben beginnenden Fällung mit Petroläther versetzt worden ist, auf eine mit Petroläther vorbereitete Talcum-Säule unter mäßigem Saugen gegossen und mit Äther + Petroläther (5 : 2) entwickelt. Man erhält eine gelbgrüne, darunter eine gelblichgraue und schließlich eine rein graue Zone, von denen die letztere kleine Mengen des krystallisierten Anlagerungsproduktes $C_{39}H_{42}O_7N_4$ liefert, falls mit Äther eluiert wird.

e) Bei der *Überführung von Phäophorbid b* in das entsprechende *Chlorophyllid* (mittels GRIGNARDscher Lösung) haben FISCHER und SPIELBERGER die aus 0,5 g Phäophorbid erhaltene Pyridin-Äther-Lösung gewaschen, auf 70 cm³ eingeengt und auf eine (mit Äther + Petroläther hergestellte) Talkschicht (8 × 5 cm) gegossen. 3 mg durchgelaufenes Chlorophyllid schieden sich beim Eindunsten der Lösung (über Wasser) krystallinisch aus, während der im Adsorbens festgehaltene Farbstoffanteil, welcher mit Aceton + Pyridin sich eluieren läßt, nicht krystallisierte.

Synthese des Desoxo-phyllerythro-ätioporphyrins $C_{32}H_{36}N_4$ (FISCHER und HOFMANN). Das genannte Endprodukt wurde auf folgendem Wege aus dem Porphyringemenge herausgearbeitet.

Eine möglichst konzentrierte ätherische Lösung des Gemisches (3 g in 15 l) wird in einem konischen Glasrohr (70 × 12 cm) im Verlaufe von mehreren Tagen langsam durch Talcum gesaugt und

das im oberen Drittel fixierte gesamte Porphyrin mit Äther + Chloroform (10 : 1) entwickelt. Das Ätioporphyrin wandert langsam nach unten, während das Desoxo-phyllerythro-ätioporphyrin oben festgehalten wird. Dieser obere Teil wird abgetrennt und durch Digerieren mit viel Pyridin eluiert. Man dampft im Vakuum ein, löst in möglichst wenig Äther und chromatographiert nochmals, wodurch geringe Ätioporphyrinreste entfernt werden. Zwischen den beiden Zonen entsteht ein rein weißer Bezirk. Man eluiert das Hauptprodukt mit Pyridin, engt ein, nimmt mit Äther auf und wäscht Pyridinreste weg. Beim Konzentrieren erscheinen feine Nadeln.

Reinigung von Phylloporphyrinester, erhalten durch Ameisensäureabbau aus Chlorin e: FISCHER und BAUER (Talcum; Elution mit Pyridin + Äther).

2. Porphyrine und verwandte Farbstoffe aus Harn und Kot.

Die Farbstärke des normalen Harnes wird bei der Filtration durch die Aluminiumoxyd-Säule nicht vermindert, während eine alkoholische Urochromlösung als braungelbe Zone hängen bleibt; mit Wasser läßt sich das Urochrom restlos eluieren (WALDENSTRÖM).

Für die Untersuchung der bei gewissen Erkrankungen (Porphyrinurie, Bleivergiftung) auftretenden *roten Harnfarbstoffe* wurde die Chromatographie von WALDENSTRÖM nutzbar gemacht. Das vorwiegend angewandte Aluminium oxydatum anhydr. puriss. Merck läßt die normalen Pigmente des Harnes durch, es bindet jedoch die Porphyrine, nebst anderen Farbstoffen pathologischer Herkunft. Es eignet sich demnach sehr gut zur Pigmentanreicherung. Der Vorgang verläuft günstiger als die bisher geübten Analysenmethoden, mit welchen manchmal eine Kombination möglich ist (zunächst Adsorption, dann Verarbeitung auf anderem Wege).

Die Stoffaufnahme erfolgt direkt aus dem Harn, also aus wäßriger Lösung. Das Chromatogramm wird nicht ausgepreßt, sondern man befreit die Säule durch energisches Durchspülen von ihrem Pigmentgehalt.

Apparatur: An einem 1-l-Scheidetrichter ist ein Abflußrohr (20 × 3,5 cm) angeschmolzen, das unten mit einem Hahn endigt (Lochdurchmesser 0,8 cm). Man drückt über dem Loch einen feuchten

Wattebausch fest, gießt das Adsorbens 5—10 cm hoch in das Rohr und schwemmt durch Schütteln mit Wasser gut auf. Nach dem Absetzen wird der Apparat auf eine Saugflasche montiert und das Wasser (bis auf eine 1-cm-Schicht) langsam durchgesaugt.

Man stellt den gesamten Harn genau auf einen Gehalt von 1 bis 2% freier Essigsäure ein und läßt ihn entlang eines fast bis zum Adsorbens reichenden Glasstabes vorsichtig einfließen. Dann wird der unten angebrachte Hahn geöffnet und die Flüssigkeit durchsickern gelassen, eventuell unter sehr schwachem Saugen.

Beispiel. Diagnose: *akute Porphyrie.* Harn (730 cm^3) neutral, dunkelrot, Aldehydreaktion (EHRLICH) negativ. Der essigsauer gemachte Harn wird mit Äther ausgezogen, wobei etwas Koproporphyrin in Lösung geht. Man filtriert vom gleichzeitig entstandenen Niederschlag ab und chromatographiert das Filtrat wie beschrieben. Es zeigt sich zuerst im oberen Bezirk der Al_2O_3-Säule eine rotbraune Zone, die nach unten wandert. Die Schicht zwischen ungefärbter Säule und dunkelroter wird gelbbraun, der oberste Teil färbt sich allmählich kräftig schwarzrot. Man wäscht zum Schluß mit 1proz. Essigsäure nach und eluiert mit 20proz. Essigsäure. Die braune Zwischenschicht und dann das rote Pigment werden getrennt aufgefangen; sie sind porphyrinfrei. Man wäscht die Kolonne mit viel Eisessig und saugt, wobei alle Farbstoffe mit Ausnahme des obersten Ringes eluiert werden. Diese Fraktion ist stark porphyrinhaltig. Nach dem Waschen mit Wasser (wobei eine schmale, rote, porphyrinhaltige Zone nach unten geht) werden mittels 12proz. Ammoniak die restlichen Pigmente als dunkelrote Fraktion herausgelöst; das Al_2O_3 entfärbt sich. Die NH_3-Lösung zeigt einen sehr hohen Gehalt an Porphyrinen. Sie wurde schwach essigsauer gemacht und, da der Farbstoff nicht ausfiel, die Chromatographie wiederholt. Nachher konnte das Pigment mit Essigsäure ausgeflockt und der Bestimmung zugeführt werden.

Man sieht, daß eine Fällung ohne zweimalige Chromatographie überhaupt nicht entstanden wäre und daß nur die Adsorptionsmethode die Gewinnung dieser Fraktion ermöglicht hat. Nach durchgeführter Chromatographie ist der Harn hellgelb gefärbt, die spektroskopische Kontrolle des Porphyringehaltes daher einfach. Die Methode eignet sich auch für kleine Urinmengen (10 cm^3) sowie für porphyrinarme Harne.

Bekanntlich wird die rote Farbe des Harnes in Fällen von akuter

Porphyrie hauptsächlich von *Begleitern* bedingt, die nicht zu den Porphyrinen zählen. Zur näheren Prüfung dieser noch ***ungeklärten Pigmente*** wurde der Harn wie beschrieben adsorbiert. Der Porphyringehalt bleibt oben hängen, außerdem entsteht eine rote Zone, die recht rasch abwärts wandert. Man leitet den Versuch so, daß die letztere Fraktion durchlaufe. Der abfließende Harn ist nun dunkelrot, aber trotzdem porphyrinfrei. Man nimmt damit eine zweite Chromatographie vor, wäscht die Säule mit Methanol aus, dann mit methylalkoholischem NH_3 und eluiert schließlich das Pigment mit Hilfe von stark verdünntem Ammoniak.

Porphyrine aus Kot. Diagnose: Fall PETRY. Aus dem getrockneten und fein gemahlenen Kot wurde ein Eisessig-Äther-Auszug bereitet, das Porphyrin in HCl getrieben, diese mit Acetat bis zur Kongo-negativität abgestumpft und die Lösung auf die Al_2O_3-Säule gebracht. Es läuft eine gelbrote Lösung durch, das Porphyrin bleibt oben hängen. Nach dem Waschen mit Wasser und dann mit Äther wird Eisessig aufgegossen. Das Porphyrin geht, ohne sich aufzuteilen, in Lösung, die man mit viel Äther vermengt. Die Essigsäure wird mit Wasser weggewaschen und die nur schwach saure Lösung adsorbiert. Mit Hilfe von stärker essigsaurem Äther (1%) erhält man nun ein richtiges Chromatogramm. Zunächst wandert eine schwächere grüne Zone nach unten (ein Koproporphyrin) und dann der überwiegende Anteil des Porphyringehaltes.

Auch die synthetisch bereiteten Koproporphyrine I und III lassen sich chromatographisch trennen.

3. Gallenfarbstoffe.

Auf diesem Gebiete hat die Chromatographie bisher nur spärlich Anwendung gefunden.

a) Verhalten des Blutserum-Bilirubins. Trennung von den Carotinoiden des Serums.

Nach SÜLLMANN, SZÉCSÉNYI-NAGY und VERZÁR wird Bilirubin aus seiner Petrolätherlösung (durch Ausschütteln einer angesäuerten wäßrig-alkoholischen Lösung bereitet) von wasserfreiem Natriumsulfat adsorbiert, und zwar bedeutend stärker als Lutein. Das Filtrat ist farblos. Diese Methode versagt jedoch im Falle von Serumextrakten, wahrscheinlich unter dem Einfluß von Lipoiden,

indem überhaupt kein Pigment adsorbiert wird. Dasselbe beobachtet man nach dem Versetzen einer petrolätherischen Lösung von reinem Bilirubin + Lutein mit Cholesterin.

Viel geeigneter ist Aluminiumoxyd (Merck, für Adsorptionszwecke), welches Bilirubin (und noch stärker die Produkte, die durch Ultraviolettbestrahlung von Natrium-bilirubinat in Weingeist entstehen) aus alkoholischer Lösung festhält.

Zur Trennung von *Bilirubin und Lipochrom des menschlichen Blutserums* verfährt man wie folgt: Je 10 cm³ Serum werden in 75 cm³ Alkohol gebracht, ½ Stunde im Dunkeln stehengelassen und durch einen Glasfiltertiegel (G_3) filtriert. Man wäscht die Fällung zweimal mit Alkohol nach, das zweitemal unter Zusatz von etwas Petroläther. Die aus dem Extrakt in Petroläther übergeführten Serumfarbstoffe wurden auf Al_2O_3 chromatographiert:

Oben: gelb, mit Petroläther uneluierbar, nach Sprit-elution diazotierbar: *Bilirubin*,
rotgelb, mit Alkohol leicht eluierbar. Bei der Verteilung zwischen Petroläther und 87proz. Alkohol hypophasisch: *Xanthophylle*,
unten: rotgelb, bei der Entmischung epiphasisch: *Carotine*.

Eine feinere Aufteilung war hier, im Hinblick auf die sehr geringe Serummenge, nicht zu erwarten. Die Fraktionen können quantitativ bestimmt werden.

b) Harn.

Das *Urobilin* wird, analog dem Urochrom (S. 83), nur aus den ersten Kubikzentimetern des schwach essigsauren Harnes von Al_2O_3 zurückgehalten. Aus gallenfarbstoffhaltigen Harnen werden Bilirubin und Biliverdin adsorbiert (WALDENSTRÖM).

c) Abbauprodukte.

Der aus Mesobilirubinogen durch Ferrichlorid-oxydation erhaltene Farbstoff wurde von SIEDEL in Chloroform übergeführt und die stark eingeengte Lösung nach Zusatz von 1 Vol. Äther auf Talcum aufgeteilt (Entwickeln mit Chloroform + Äther 2 : 1). Es bildeten sich zwei scharf abgegrenzte Zonen aus: oben hellrot, unten violett (Hauptanteil). Der rote Farbstoff wurde *Mesobilirhodin* genannt, der violette ist *Mesobiliviolin*. Die Formeln zeigen, daß kleine Varianten im Molekülbau in der Analyse sich stark auswirken (S. 87).

4. Carotinoide.

Das Gebiet der Carotinoide ist, wie erwähnt, ein klassischer Anwendungsbereich des TSWETTschen Verfahrens, nicht nur weil die moderne, präparative Arbeit gerade hier einsetzte (Geschichtliches: S. 12), sondern namentlich aus folgendem Grunde. Der analoge Bau bedingt ein sehr weitgehend ähnliches Verhalten, in bezug auf Löslichkeit und Krystallisierbarkeit von gewissen Carotinoiden, wogegen die Adsorptionsaffinitäten, wie S. 22 bereits vermerkt, sehr fein abgestuft sind. Während man daher innerhalb mancher anderer Körperklasse oft auch mit Hilfe älterer Methoden eine Reindarstellung erreichen kann, gibt es in bezug auf carotinartige Farbstoffe eine Fülle von Aufgaben, welche nur auf chromatographischem Wege lösbar sind.

Oben: Mesobilirhodin. Unten: Mesobiliviolin.

Ist in einer Droge ein Hauptcarotinoid enthalten, dessen Menge stark überwiegt (Lycopin in der Tomate), so kann dasselbe freilich auch ohne Adsorptionsanalyse leicht isoliert werden; Schwierigkeiten entstehen erst bei der Diagnose und Abscheidung von geringfügigen Nebenfarbstoffen, die in der Mutterlauge verbleiben. Meist wird indessen das native Pigment verwickelter zusammengesetzt sein, so daß gewisse Komponenten entweder gar nicht in feste Form zu bringen sind oder ein Mischkrystallisat bilden. Ebenso ist ein Adsorptionsversuch unerläßlich, wenn es sich nicht um die Isolierung handelt, sondern um Nachweis bzw. colorimetrische Bestimmung der einzelnen Polyene, welche im Pflanzenmaterial oder in tierischen Organen und Flüssigkeiten enthalten sind.

Vorbereitende Operationen.

Die Scheidung vieler Einzelfarbstoffe in derselben Säule ist unzweckmäßig und aus praktischen Gründen nicht immer leicht durchführbar. In komplizierteren Fällen zerlege man daher das Gesamtpigment zunächst in einige Hauptanteile (den Unterklassen der Carotinoide entsprechend) und bereite dann mit jeder Fraktion ein besonderes Chromatogramm, auf dem jeweils geeigneten Adsorbens. Wie auf vielen anderen Gebieten der Naturforschung, wird auch hier eine schwierige Analyse durch mehrere leichtere ersetzt.

Entmischungsversuch.

Als ein vortreffliches Hilfsmittel dient hierzu der altbewährte Entmischungsversuch, nämlich die Verteilung des Gesamtfarbstoffes zwischen zwei miteinander nicht mischbaren Lösungsmitteln: meist Petroläther (evtl. mit Äther vermengt), die Oberschicht bildend, und wäßriger Methanol (z. B. 90proz.) als untere Phase (vgl. WILLSTÄTTER und STOLL). Schon TSWETT (1) unterscheidet „*epiphasische*" und „*hypophasische*" Farbstoffe, je nachdem die Hauptmenge, nach dem Durchschütteln, oben oder unten im Scheidetrichter vorzufinden ist. Die wichtigsten Carotinoide verteilen sich in charakteristischer Art und können (wenn nötig, nach wiederholter Erneuerung derjenigen Schicht, welche sie größtenteils aufnimmt) quantitativ abgetrennt werden.

Epiphasische Carotinoide: Polyen-kohlenwasserstoffe $C_{40}H_{56}$ und die veresterten Polyen-alkohole (Farbwachse).

Hypophasische Carotinoide: Die freien Polyen-alkohole und die Oxyketone Capsanthin und Capsorubin. Das Diketon Rhodoxanthin geht hälftig in beide Schichten. Krypto- und Rubixanthin verhalten sich nur hypophasisch, wenn der Alkohol mindestens 95proz. ist; schwächerer Alkohol überläßt sie der Oberschicht.

Epiphasische, nach der Verseifung aber hypophasische Carotinoide: Farbwachse. Ihr Entmischungsverhalten wird durch Behandlung mit methylalkoholischem Kali umgekehrt.

In manchen Fällen läßt sich eine noch weiter gehende Fraktionierung erreichen:

a) Schüttelt man eine äther-petrolätherische Lösung (1 : 1) von Xanthophyll + Fucoxanthin dreimal mit 70proz. Methylalkohol, so

gelangt alles Fucoxanthin, aber nur wenig Xanthophyll in die untere Phase (WILLSTÄTTER und PAGE).

b) Unterscheidung von Lutein und Violaxanthin (KUHN und WINTERSTEIN 1). Schüttelt man 10 cm³ der äther-petrolätherischen Lösung (1 : 1) viermal mit je 2 cm³ 70proz. Methanol, so geht doppelt soviel Violaxanthin als Lutein in die Unterschicht. Läßt man dieselbe ab und schüttelt sie mit 5 cm³ Äther + Petroläther durch, so sucht Lutein quantitativ, Violaxanthin nur zum Teil die obere Schicht auf.

Wie ersichtlich, stehen mehrere *günstige Kombinationen als Vorbereitung* der Adsorptionsanalyse zur Verfügung:

1. Man entmischt den Gesamtauszug und treibt so die freien Polyenalkohole in die untere Phase. Die Oberschicht wird abgehoben, über konz. methanolischem Kali stehengelassen, alkalifrei gewaschen und mit schwach wasserhaltigem Methanol geschüttelt. Die im Gewebe als Ester vorgelegenen Polyen-alkohole wandern nun nach unten und werden für sich abgetrennt. Mit den drei Anteilen nimmt man gesondert Adsorptionsanalysen vor.

2. Häufig ist es hinreichend und empfehlenswert, das native Pigment mit Äther auszuziehen oder in Äther überzuführen, welcher dann $^1/_2$—1 Tag mit 30proz. methanolischem Kali bei Luftabschluß stehengelassen wird. Man versetzt die Flüssigkeit mit viel Wasser, wäscht die Oberschicht alkalifrei und entmischt dieselbe, nach Zusatz von Petroläther, mit wasserhaltigem Methanol. Die oben verbliebenen Farbstoffe werden gesondert chromatographiert, ebenso auch die hypophasischen. Die letzteren führt man mit Wasser in Petroläther oder Äther über, trocknet die Lösung mit Natriumsulfat, dampft sie im Vakuum ab, nimmt den Rückstand mit einem geeigneten Solvent auf und zerteilt ihn in der Adsorptionssäule.

3. Es sollte stets auch versucht werden, ob das native, noch nicht entmischte Pigment sich direkt chromatographisch festhalten und aufteilen läßt, eventuell unter Anwendung von zwei Adsorptionsmitteln im gleichen Rohr (ein Beispiel s. S. 101). Diese Arbeitsweise, bei welcher man zunächst keinen Farbstoff verliert, wird namentlich für pflanzliche Extrakte anwendbar sein, seltener bei der Verarbeitung von tierischem Lipochrom. Nach dem Ausschneiden und der Elution einzelner Bezirke folgen Entmischungs- bzw. sonstige Reinigungsoperationen.

4. Wie aus den unten mitgeteilten Beispielen hervorgeht, gibt es noch eine weitere Anzahl von Varianten der Arbeitsweise.

Liegt sehr wenig Farbstoff in großer Verdünnung vor, so kann man zunächst das gesamte Pigment in einem stark wirkenden Adsorptionsmittel, z. B. $Ca(OH)_2$ oder Al_2O_3, summarisch festhalten. Entweder erhält man sofort ein Chromatogramm oder das Eluat wird von farblosen Begleitern weitgehend befreit und in einem neuen Versuch aufgeteilt, eventuell erst nach Durchführung einer vorbereitenden Operation.

Anwendung von Lösungs- und Adsorptionsmitteln. Elution.

Auf dem Polyengebiet wird man mit einigen Materialien auskommen. Die drei Carotine α, β und γ scheiden sich am besten aus petrolätherischer Lösung, auf Calciumhydroxyd (Karrer und Walker); auch Aluminiumoxyd und Benzin oder Benzol + Benzin sind für Polyen-kohlenwasserstoffe und für die Farbwachse verwendbar. Verschiebt man dabei das Mengenverhältnis mehr zugunsten des Benzols, so läßt sich ein selektiveres Säulenbild erzielen, aber weniger Farbstoff in der gleichen Menge des Adsorptionsmittels verarbeiten. Ein Gemisch von Polyen-alkoholen wird zweckmäßig aus Schwefelkohlenstoff, in der Calciumcarbonat-Säule zerlegt. In Benzollösung kann man auch die sauerstoffhaltigen Carotinoide auf Calciumhydroxyd bearbeiten und man erzielt den Vorteil, daß größere Mengen Farbstoff eingeführt werden können. Die Elution ist allerdings manchmal erschwert und geschieht dann in der Wärme.

Zur Elution von Polyenen dient allgemein Methyl- oder Äthylalkohol; meist genügt ein kleiner Zusatz davon ($^1/_2$—1%) zum Benzol, Benzin, Äther usw., um die Adsorptionskräfte aufzuheben.

Kurze Angaben über das Adsorptionsverhalten einzelner Carotinoide (s. die Formeln auf S. 25—27).

α-, β- und γ-Carotin. α zeigt die schwächste, γ die stärkste Adsorptionsaffinität. Die drei Carotine werden auf Aluminiumoxyd, z. B. aus Benzin, einzeln festgehalten, besonders gut differenziiert auf Calciumhydroxyd. Nach Tswett (22) ist Carotin der einzige Farbstoff des grünen Blattes, der aus Petroläther von Saccharose, Inulin oder Calciumcarbonat sich nicht adsorbieren läßt. Das gleiche gilt für die Kombination $CaCO_3$-Schwefelkohlenstoff.

Lycopin bleibt, wie die isomeren Carotine, auf Calciumcarbonat kaum hängen (nur im Falle hoher Dispersität des Pulvers), obzwar es an Adsorbierbarkeit die Carotine überflügelt. Sehr geeignet sind

Aluminiumoxyd, Magnesiumoxyd und Calciumhydroxyd (Lösungsmittel: Benzol oder Benzin).

Kryptoxanthin. Man verwende Calciumhydroxyd oder Calciumcarbonat und z. B. Benzin; Entwickeln mit Benzol + Benzin. Das Kryptoxanthin $C_{40}H_{56}O$ nimmt stets einen tieferen Platz in der Säule ein, als die Xanthophylle $C_{40}H_{56}O_2$.

Rubixanthin verhält sich wie Kryptoxanthin und wird davon auf chromatographischem Wege kaum getrennt.

Lycoxanthin und **Lycophyll** lassen sich in der $CaCO_3$-Säule festhalten, und zwar aus Benzin. Wendet man jedoch Benzol an, so genügt die Carbonat-Säule nicht mehr und man muß $Ca(OH)_2$ oder Al_2O_3 anwenden. So wie das Lycopin stärker adsorbiert wird als β-Carotin, so wird auch das Lycoxanthin (Oxy-lycopin) oberhalb des Kryptoxanthins (Oxy-β-carotin), das Lycophyll (Dioxy-lycopin) oberhalb des Zeaxanthins (Dioxy-β-carotin) fixiert.

Lutein (Xanthophyll) bleibt aus CS_2 oder Benzin auf Calciumcarbonat hängen und nimmt die S. 23 verzeichnete Lage ein. Das A-Vitamin oder die Polyen-kohlenwasserstoffe passieren die Säule.

Zeaxanthin. Verhalten dem Lutein ähnlich. Von β-Carotin und Kryptoxanthin, welche das gleiche Spektrum zeigen, läßt sich das Zeaxanthin auf $CaCO_3$ mittels CS_2 oder Benzol + Benzin (1 : 5) trennen und nimmt den obersten Platz ein.

Antheraxanthin, Petaloxanthin und **Flavoxanthin** (alle mit 3 OH-Gruppen) belegen in dieser Reihenfolge Zonen von oben nach unten. Anthera- und Petaloxanthin schienen zunächst identisch zu sein und wurden ausschließlich auf chromatographischem Wege differenziiert.

Fucoxanthin, Violaxanthin und **Taraxanthin**, mit 6, 4, 4 O-Atomen, sind der chromatographischen Scheidung zugänglich, z. B. aus Benzin + Benzol, auf Al_2O_3 oder $CaCO_3$.

Rhodoxanthin wird aus Benzin an Calciumcarbonat schlecht adsorbiert; es bildet unterhalb der Polyen-alkohole eine Zone, welche sich auswaschen läßt. Dagegen nimmt es Al_2O_3 aus Benzin oder Benzin + Benzol als tiefviolette Scheibe auf.

Capsanthin und **Capsorubin** werden in der $CaCO_3$-Säule aus CS_2 oder Benzin gut fixiert; auch die Scheidung der beiden Farbstoffe erfolgt zufriedenstellend. Die Capsanthin-*ester* stehen im $CaCO_3$-Chromatogramm (Benzin) höher als Zeaxanthin- und Lutein-Farbwachse.

Bei der **quantitativen Bestimmung der Carotinoide** sind ähnliche Gesichtspunkte entscheidend wie für die Isolierung. An die Elution der abgetrennten Pigmentanteile schließt sich hier eine colorimetrische Messung an. Nach KUHN und BROCKMANN (3), die für die Bestimmung der wichtigsten Vertreter der Reihe einen systematischen Arbeitsgang beschrieben haben, geschieht die Messung am besten im Mikrocolorimeter.

Als Standard (10-mm-Schicht) dient eine Lösung von 14,5 mg reinem *Azobenzol* in 100 cm³ 96proz. Alkohol. Die Farbgleichheit zeigt in je 1 cm³ Benzin (Siedep. 70—80°) an: 0,00235 mg α- oder β-Carotin, 0,00242 mg Kryptoxanthin, 0,00252 mg Lutein (Xanthophyll) oder Zeaxanthin, 0,0027 mg Tara- oder Violaxanthin, 0,0046 mg Physalien oder Helenien. — Eine zehnmal stärkere Azobenzollösung indiziert 0,0078 mg Lycopin bzw. 0,0095 mg Capsanthin oder 0,0098 mg Capsorubin pro Kubikzentimeter.

Die Identifizierung der einzelnen Carotinoide,

welche chromatographisch aus einem Gemenge herausgearbeitet wurden, stützt sich vor allem auf die *spektroskopische Messung*. Diese ist in zahlreichen Fällen zuverlässig, namentlich wenn auch das sonstige Verhalten des betreffenden Farbstoffes in Betracht gezogen wird (Entmischungsprobe, Farbnuance in Lösung und in der Säule, relative Stellung der Scheibe, Farbreaktionen usw.). Es sei indessen auch hier daran erinnert, daß für das Zustandekommen des Spektrums nicht das Gesamtmolekül verantwortlich ist, sondern nur die chromophore Gruppierung. Verschiedene Polyene mit dem gleichen Chromophor zeigen daher die nämlichen optischen Schwerpunkte; so sind z. B. β-Carotin, Kryptoxanthin und Zeaxanthin optisch nicht zu unterscheiden (vgl. die Strukturformeln S. 25—27), wohl aber durch ihr abweichendes Verhalten bei der Entmischung.

Zeigt die Lage des Spektrums bedeutende Verschiebung gegenüber dem Erwarteten, so ist Nicht-identität bewiesen, die chromatographische Einheitlichkeit vorausgesetzt. Anderseits wird man aber das letzte Wort über eine im Spektroskop gefundene Identität zweier Polyene erst auf Grund des Misch-chromatogramms aussprechen oder, wenn tunlich, nach der Abscheidung eines krystallisierten Präparates. Gerade dadurch, daß die letztere Operation nicht vorgenommen wurde, ist manche, an sich wohl gute Angabe der älteren Literatur mit einer mehr oder minder großen Unsicherheit belastet.

Es besteht, analoge Struktur vorausgesetzt, ein *einfacher Zusammenhang zwischen Spektrum und Adsorptionsverhalten* mancher Carotinoide (vgl. WINTERSTEIN 1): Je länger das konjugierte Doppelbindungssystem ist, um so stärker gibt sich die Adsorptionsaffinität kund, aber um so mehr werden auch die Extinktionsmaxima nach dem Langwelligen verschoben. Dies zeigt sich in

vielen Fällen sehr eindrucksvoll bei dem Betrachten des Chromatogramms, in welchem die Farbtiefe von oben nach unten abnimmt, z. B.:

Oben:	Lycopin	$C_{40}H_{56}$,	13 F	(11 konj.):	548, 507 $\mu\mu$ (in CS_2),
	γ-Carotin	$C_{40}H_{56}$,	12 F	(11 konj.):	533,5, 496 $\mu\mu$,
	β-Carotin	$C_{40}H_{56}$,	11 F	(11 konj.):	521, 485,5 $\mu\mu$,
unten:	α-Carotin	$C_{40}H_{56}$,	11 F	(10 konj.):	509, 477 $\mu\mu$.

Wie S. 30 erwähnt, besteht eine ähnliche Beziehung bei gewissen polycyclischen Kohlenwasserstoffen der aromatischen Reihe.

Bei den *sauerstoffhaltigen* Carotinoiden liegen die Verhältnisse nicht immer so einfach, namentlich weil der, in der Säule dem Farbstoff relativ zukommende Platz von der adsorptiv außerordentlich stark wirksamen Hydroxylgruppe entscheidend bestimmt wird. So steht z. B. das Zeaxanthin (2 OH-) höher als Kryptoxanthin (1 OH-), obzwar die optischen Schwerpunkte zusammenfallen (519, 483 $\mu\mu$, in CS_2). Hingegen werden die rotvioletten Oxyketone Capsanthin und Capsorubin an einer höher liegenden Stelle adsorbiert als die orangegelben und gelben Polyenalkohole (vgl. S. 22).

Teilweise Isomerisierung des Carotins in der Adsorptionssäule.

Während das Carotin bisher als ohne Änderung adsorbierbar galt, haben neue Versuche von GILLAM und EL RIDI (1, 3) gezeigt, daß dies nicht mit aller Schärfe richtig ist. Die nachstehenden Tatsachen sind beachtenswert, weil sie gewisse Grenzen der Analyse aufdeckten. Die praktische Anwendbarkeit des TSWETTschen Verfahrens wird dadurch nicht berührt.

Der Ausganspunkt dieser Untersuchungen war die Beobachtung, daß der α-Carotingehalt der Butter in der Aluminiumoxyd-Säule sich stets als höher erwies, als wenn die Adsorption auf Magnesiumoxyd vorgenommen wurde. Eine genauere Prüfung zeigte dann, daß Al_2O_3 imstande ist, das β-Carotin bei *wiederholter* Adsorption teilweise zu *isomerisieren*. Dabei erscheint, wenn lange genug entwickelt wird, unterhalb der Hauptzone eine gelbe Schicht, welche jedoch kein α-Carotin, sondern ein neues Polyen, das sog. *Pseudo-α-carotin* $C_{40}H_{56}$, enthält. Obzwar die optischen Schwerpunkte zusammenfallen, erwiesen sich die beiden Kohlenwasserstoffe in wichtigen Punkten als voneinander abweichend (Tabelle 10, S. 94).

Tabelle 10. Vergleich von α-Carotin und Pseudo-α-Carotin.

	α-Carotin	Pseudo-α-carotin
Formel	$C_{40}H_{56}$	$C_{40}H_{56}$
Schmelzpunkt . . .	166° (unkorr.)	187° (unkorr.)
Spez. Drehung (Cd-Licht)	+ 380°	0°
Adsorption auf Al_2O_3 gibt (teilweise) . .	„Neo-carotin"	β-Carotin oder ähnliches

Das Pseudo-α-carotin stimmt in bezug auf Zusammensetzung, Wasserstoffaufnahme, Spektrum, Provitamin-A-Wirkung mit dem natürlichen α-Carotin überein. Es wird von GILLAM und EL RIDI (3) angenommen, daß unter der Einwirkung des Aluminiumoxyds entweder eine cis-trans-Umlagerung stattfindet oder der Platzwechsel einer Doppelbindung. Es ist aber auch die Möglichkeit nicht ganz auszuschließen, daß das Pseudo-α-carotin racemisches α-Carotin ist.

Darstellung von krystallisiertem Pseudo-α-carotin $C_{40}H_{56}$ aus β-Carotin $C_{40}H_{56}$, nach Gillam *und* el Ridi (3).

200 mg reines β-Carotin (aus Gras, optisch inaktiv) wurde in Petroläther (Siedep. 70—80°) gelöst, auf eine *Al_2O_3-Säule* gegossen (50 × 6 cm; 1 Teil nach BROCKMANN standardisiert, Merck + 3 Teile unaktiviertes Oxyd) und mit Petroläther (oder Petroläther + Benzol) nachgewaschen. Diese erste Adsorption zeigt in der Regel keine merkbare Aufteilung des Farbstoffes. Als man jedoch den angefärbten Säulenteil mit alkoholhaltigem Petroläther eluierte und das gewaschene, getrocknete Eluat nochmals adsorbierte, erfolgte Zerfall in zwei Scheiben. Bei fortgesetzter Entwicklung gelangte dann die tiefer liegende Zone in das Filtrat und wurde gesondert aufgefangen. Nun hat man das unveränderte β-Carotin (oberer Farbring) wie angegeben eluiert und noch vier- bis fünfmal adsorbiert, um eine möglichst vollständige Isomerisation zu erzielen. Schließlich lieferten 200 mg β-Carotin 80—100 mg Pseudo-α-carotin (in etwa 4 l Flüssigkeit), während das Defizit durch Oxydation, unvollständige Elution usw. verloren ging. Die durchgesickerte Lösung wurde im Vakuum (N_2) eingeengt und von etwas Al_2O_3 filtriert. Sie lieferte beim Abkühlen ein Krystallisat, das aus Petroläther umkrystallisiert wurde. Schwerpunkte in Schwefelkohlenstoff: 507, 477 μμ, in Benzin: 477, 446 μμ (fast genau das Spektrum des α-Carotins).

Wir haben den obigen Versuch mit 100 mg reinstem β-Carotin (auf Al_2O_3) wiederholt, konnten aber mit unseren Materialien ers

nach sechsmaliger Chromatographie eine belanglose Zone unten erhalten, die das Spektrum des Pseudo-α-carotins besaß. Die opt. Schwerpunkte des zurückgewonnenen β-Carotins waren unverändert und scharf ausgeprägt. Diese qualitative Bestätigung zeigt, daß der von den genannten Forschern beschriebene Effekt *in der Praxis kaum stören* dürfte.

Wird *Ca(OH)*$_2$ statt Al_2O_3 angewandt, so findet nach GILLAM und EL RIDI (3) die gleiche Isomerisation statt, wenn auch mit geringerer Ausbeute. *Magnesiumoxyd* ist unwirksam; es verrät übrigens nicht einmal die Heterogenität eines künstlichen Gemisches von β- und Pseudo-α-carotin. Immerhin sinken die Wellenlängen des β-Carotin-Spektrums, bei wiederholter Adsorption auch in der MgO-Säule.

Geht man von *α-Carotin* aus, so entsteht in einem analogen Versuchsgang das „Neo-carotin", und zwar auch auf Magnesiumoxyd; in CS_2: 501, 470 μμ, in Benzin: 470, 441 μμ.

Alle diese Vorgänge sind *reversibel*: aus Pseudo-α-carotin konnte β-Carotin (oder etwas ganz Ähnliches) zurückgewonnen werden usw. In der Säule sieht man stets eine Zweiteilung. Eine herausgeschnittene und entfernte Komponente erscheint im Verlauf weiterer Adsorptionsversuche wieder.

Es sei schließlich betont, daß die referierten Verwandlungen durch gewisse Begleitstoffe gefördert werden; so genügt für Rohlösungen von Butter- oder Blutserum-carotin eine einzige Adsorption, während man, ausgehend von reinsten β-Carotin-Präparaten, länger waschen oder eluieren und readsorbieren muß. Die Inhaltsstoffe des ungereinigten Extraktes dürften teils als schwache Elutionsmittel wirksam sein.

A. Beispiele zur Verarbeitung von Pflanzencarotinoiden.

(Vgl. auch Tabelle 11, S. 106 und 12, S. 112.)

Trennung von α-, β- und γ-Carotin.

Nach KARRER und WALKER (1) gelingt die Trennung der Carotine am besten auf käuflichem, fein gemahlenem, gelöschtem Kalk, z. B. in Petrolätherlösung. Reihenfolge von oben nach unten: γ-, β-, α-Carotin (s. auch KARRER und SCHLIENTZ). Das Lycopin steht noch höher als γ-Carotin.

Kuhn und Brockmann (8) haben aus einem *Karotten-Handelspräparat,* dessen Pigment etwa 15% α-, 85% β- und 0,1% γ-Carotin enthalten hat, das in 1000facher Verdünnung vorgelegene *γ-Carotin* folgend isoliert: Das dreimal aus Benzol + Methanol und dann aus Benzol und Benzin umkrystallisierte und vor jeder Umscheidung zweimal mit reinstem Methanol ausgekochte Ausgangsmaterial (3 g) wurde in 300 cm^3 reinstem Benzol gelöst, mit 900 cm^3 reinem Benzin (Siedep. 70—80°) verdünnt und durch eine Säule aus Fasertonerde (17 × 5 cm; 500 g) filtriert. Das γ-Isomere bleibt am stärksten haften, während die übrigen rascher abwärts wandern. Man wäscht z. B. mit 1 l Benzol + Benzin (1 : 4) so lange nach, bis sich eine deutlich abgegrenzte, rötliche Zone von γ-Carotin gebildet hatte und die tiefer liegenden Bezirke der Säule nur noch schwach angefärbt sind. Man eluiert die rotgelbe Schicht (unter Verwerfung der Ränder) sofort mit methanolhaltigem Benzin, wäscht den Alkohol gründlich weg, trocknet und wiederholt die Adsorption samt nachfolgenden Operationen noch zweimal, in einem kleineren Rohr. Schließlich saugt man das Eluat durch ein Glassinterfilter, dampft es im Vakuum ab, kocht den Rest zweimal mit Methylalkohol aus und krystallisiert das Ungelöste aus wenig Benzol + Methanol (1 : 1) um. Rohausbeute 1 mg γ-Isomeres pro Gramm Gesamtcarotin. Zur Reinigung wurde dreimal aus Benzol + Methanol (2 : 1) umkrystallisiert; man kocht jedesmal mit Methanol aus und wäscht die Krystalle mit Petroläther.

Kryptoxanthin aus Mais (Kuhn und Grundmann 5).

Das sehr fein gemahlene und gebeutelte Mehl wurde abwechselnd, einige Male mit Alkohol und mit Benzin ausgezogen und der Gesamtfarbstoff aus den vereinigten Extrakten mit Wasser in Benzin getrieben, welcher den Zeaxanthin-Gehalt an 90proz. Methanol abgab. Nun wurde die Lösung verseift (5proz. methanolisches KOH, 4 Stunden, 35°), mit 90proz. Methanol ausgeschüttelt, gewaschen, getrocknet und auf aktiviertem Al_2O_3 chromatographiert (Entwickeln mit Benzin + Benzol 1 : 1). Eine geringe gelbe Zone ging in das Filtrat (Carotin), während das Kryptoxanthin als allmählich sich ausdehnende, nur langsam wandernde, orangegelbe Schicht haften blieb. Durch Elution mit

Alkohol läßt sich z. B. 1 mg Kryptoxanthin aus 700 g gelbem, italienischem Mais krystallisiert erhalten. Das Verfahren ist auch zur Colorimetrie der Komponenten geeignet (Messung in Benzin, gegen Azobenzol, S. 92).

Isolierung von Taraxanthin aus dem Rohkrystallisat der Taraxacum-officinale-Xanthophylle (KUHN und LEDERER 2).

Dieses Beispiel soll zeigen, wie die *spektroskopische* Messung wegleitend sein kann, falls in der Säule mehrere Pigmentkomponenten zu einer gemeinsamen Zone sich vereinigt haben. 40 mg Farbstoff wurden in 25 cm³ Benzol + 75 cm³ Benzin gelöst und durch $CaCO_3$ (15 × 10 cm) gesaugt. Nach dem Entwickeln mit 2 l Solventgemisch hat man die einheitliche, 100 mm hohe Farbscheibe willkürlich in 5 Abschnitte zerteilt, deren Polyen das folgende Spektrum zeigte:

Oben:	502, 472 $\mu\mu$	(in	Schwefelkohlenstoff	gemessen)),	
	502, 469 $\mu\mu$	(,,	,,	,,	),
	504, 471 $\mu\mu$	(,,	,,	,,	),
	507, 474 $\mu\mu$	(,,	,,	,,	),
unten:	508, 475 $\mu\mu$	(,,	,,	,,	).

Das Methanol-eluat der beiden oberen Bezirke wurde unter Benzin mit Wasser ausgefällt und der Farbstoff, wie beschrieben, nochmals chromatographiert:

Oben:	501,	474 $\mu\mu$ (CS_2),
	501,5,	470 $\mu\mu$,
	501,5,	469 $\mu\mu$,
	501,	469 $\mu\mu$,
unten:	500,5,	468 $\mu\mu$.

Man sieht, daß das Lutein (508, 475 $\mu\mu$) bereits entfernt worden ist. Der Farbstoff aus der 2. bis 5. Zone wurde wie oben angegeben gefällt und aus Methanol umkrystallisiert. Ausbeute: 8 mg Taraxanthin. Zur weiteren Prüfung der Einheitlichkeit diente wieder die Chromatographie; mit Ausnahme einer belanglosen oberen Zone (500, 473 $\mu\mu$) war das Präparat nun einheitlich (vier empirisch gewählte Bezirke: 501, 468,5 $\mu\mu$, in CS_2).

Isolierung der Paprikafarbstoffe.

Als Beispiel dafür, wie man einen verwickelt zusammengesetzten Naturstoff mit Hilfe mehrerer Ausführungsformen der Chromato-

graphie studieren kann, deren Ergebnisse sich gegenseitig ergänzen und kontrollieren, sei die Aufteilung des Capsicum-annuum-Pigments angeführt. Es wurden vier Wege befolgt (ZECHMEISTER und CHOLNOKY 2):

a) Bezüglich der **Chromatographie von Rohkrystallisaten des Capsanthins** sei, was Einzelheiten betrifft, auf das Original verwiesen; dieser Arbeitsgang erbrachte die Isolierung von *Capsanthin*, *Capsorubin*, *Zeaxanthin* und *Lutein*.

Ohne Anwendung der Adsorptionsanalyse kommt man zwar zu schön aussehenden und scheinbar einheitlichen Capsanthin-Präparaten, die aber in Schwefelkohlenstoff, auf Calciumcarbonat z. B. das folgende Bild zeigen (links Dicke der Zonen in mm):

7 rotbraun } nicht krystallisierbar,
3 rot } wohl autoxydiert,
2 dunkelviolett: Capsorubin,
3 kanariengelb: unbekannt,
28 violettrot: Capsanthin,
1 gelb }
1 violett }
1 gelb } unbekannt,
1 dunkelviolett }
4 zitronengelb }
9 orangegelb: Xanthophylle,
3 hellrosa: unbekannt.

b) Adsorptionsanalyse von verseiften Gesamtextrakten. 200 g Paprikahäute wurden mit 1,5 l leichtem Petroläther perkoliert und der Auszug, nach dem Überführen in Äther, mit methanolischem Kali verseift. Der Abdampfrückstand des alkalifrei gewaschenen Äthers lieferte in CS_2, auf $CaCO_3$ (10 Rohre) das folgende Bild:

5 braun,
20 rötlichbraun,
0,2 gelber Strich,
5 violett: Capsorubin,
5 kanariengelb (in CS_2: 508, 476 $\mu\mu$; in Äther mit HCl blau),
20 violett: Capsanthin,
fünf verschiedenfarbige, dünne Striche,
5 orangegelb: Zeaxanthin,
0,2 violett,
10 orangegelb: Kryptoxanthin,
im Filtrat: Carotin.

Die Elution mit alkoholhaltigem Äther, Verdampfen und Umkrystallisieren ergab aus den zehn entsprechenden Zonen: 150 mg

reines *Capsanthin* und 18 mg *Zeaxanthin*. Die zehn Capsorubinschichten wurden ebenso behandelt, nur mußte man das Endprodukt noch einmal in CS_2 aufnehmen und auf $CaCO_3$ unterteilen: jetzt bildete das *Capsorubin* die Hauptzone und war lediglich von einem dünnen Capsanthin-Strich, der tiefer lag, begleitet; es wurde eluiert, in Äther übergeführt und nach dem Abdampfen aus CS_2 umkrystallisiert. Auch der Farbstoffinhalt der *Kryptoxanthin*-Zonen mußte ein zweites Mal chromatographiert werden, wozu $CaCO_3$ (grob:fein = 10:1) diente (Benzin). Die Hauptmenge des Kryptoxanthins blieb als eine sehr breite, gelborange Zone hängen, darüber sah man etwas Zeaxanthin, tief unten ein wenig Carotin. Nach der Elution des Mittelteiles wurde eine dritte Adsorption vorgenommen ($CaCO_3$ 7 : 3) und das nach der Verwerfung der Grenzbezirke gewonnene Eluat in Benzol übergeführt. Wird diese Lösung öfters mit destilliertem Wasser geschüttelt, auf 2 cm^3 eingedampft und mit 10 cm^3 Methanol versetzt, so erscheinen 20 mg Kryptoxanthin.

c) Chromatographie des nativen Farbwachses, mit nachfolgender Verseifung einzelner Komponenten. Das frische, fleischige Ausgangsmaterial wurde unter CO_2, in Alkohol entwässert, getrocknet, vermahlen und das Pulver (20 g) mit 500 cm^3 Benzin (Siedep. 70—80°) bei 50° erschöpft. Chromatogramm auf $CaCO_3$ (1/4 fein; drei Rohre):

Fünf dünne Striche: wohl Oxydationsprodukte,
2 gelb,
5 violett } Ester des Capsorubins,
25 heller violett }
20 dunkelviolettrot: Capsanthin-estergemisch,
2 hellgelb: unbekannt,
vier zwirndünne Striche,
Filtrat: rötlichgelb.

Die Grenzlinie zwischen fixierten und durchgelassenen Pigmentanteilen liegt bei dieser Ausführungsform der Analyse ganz anderswo als bisher, indem der Hauptanteil der Zeaxanthin-ester in das Filtrat gelangt und dort von dem Lutein- und Kryptoxanthin-Farbwachs, nebst Carotin begleitet wird.

Die hängen gebliebenen Hauptzonen wurden mit sprithaltigem Petroläther eluiert. Aus der 20-mm-Scheibe ließ sich ein krystallisiertes Gemisch von *Capsanthin-estern* erhalten, das von Alkali in ein schönes Capsanthin-Präparat verwandelt wird, aus welchem

chromatographisch nur noch ein wenig Zeaxanthin herauszuholen war. Der Farbstoffinhalt der 5 + 25-mm-Zonen war nicht deutlich krystallinisch, er lieferte jedoch nach erfolgter Verseifung wohlkrystallisiertes *Capsorubin.* — Das durch die Säule gelaufene, rötlichgelbe Filtrat wurde ebenfalls alkalisch behandelt und dann für sich chromatographiert ($CaCO_3$, CS_2):

10 gelb: unbekannt,
20 orangegelb: *Zeaxanthin,*
30 orangegelb: *Kryptoxanthin.*

Die beiden letzten Komponenten krystallisieren leicht. Durch die Säule ging hier nur der Polyen-kohlenwasserstoff-Anteil, welcher, nachdem im Calciumhydroxyd-Chromatogramm (Benzin) eine Spur unbekannten Farbstoffes entfernt wurde, krystallisiertes *β-Carotin* liefert.

d) Chromatographie von verseiftem und re-esterifiziertem Polyenwachs. Während bei der Aufteilung des nativen Farbwachses das Bild dadurch verwickelt werden kann, daß derselbe Polyen-alkohol mit verschiedenen Fettsäuren verknüpft vorliegt, erlangt man gewisse präparative Vorteile, wenn, nach erfolgter Freilegung der Hydroxyle, von neuem eine Veresterung des gesamten Materials, aber jetzt mit einer einheitlichen Säure, durchgeführt wird. Erst dann schreitet man zur Chromatographie und gelangt leicht zu guten Präparaten. Die in der Säule beobachtete Reihenfolge der Carotinoide ist von der Wahl der angewandten Fettsäure unabhängig.

Eine Lösung von 400 mg synthetisch aus Rohcapsanthin bereitetem Caprinatgemisch in 800 cm^3 Benzin lieferte auf $CaCO_3$ das folgende Chromatogramm (8 Rohre), nachdem mit Benzin reichlich nachentwickelt wurde:

8 blaustichig rosa: Capsorubin-caprinat,
5 kanariengelb: unbekannt,
60 bräunlichrot: Capsanthin-caprinat,
10 braun: unbekannt,
10 zitronengelb: Zeaxanthin-caprinat.

Die Hauptzone wurde nochmals ebenso chromatographiert: es zeigte sich ein sprunghafter Fortschritt, indem keine Spur Zeaxanthinester mehr zugegen war. Nun hat man den Farbstoff mit methanolhaltigem Benzol eluiert und die ausgewaschene Lösung

im Vakuum auf ein kleines Volumen gebracht. Nach Zusatz von 4 Raumteilen abs. Methanols, krystallisierten innerhalb eines Tages 240 mg *Capsanthin-dicaprinat* aus. Schmelzp. 109° (korr.).

Quantitative Bestimmung der Paprika-Farbstoffe

(CHOLNOKY, unveröff.).

Auf einem analytischen Glastrichter (Schott und Gen., Jena, Durchmesser 5 cm) wird ein kleiner Wattebausch festgedrückt, auf welchen 1—3 g mehlfein gemahlene Paprikahaut geschichtet wird. Man extrahiert die Farbstoffe durch öfteres Aufgießen von je 5 cm³ heißem Benzin (Siedep. 60—80°), insgesamt etwa 200 cm³, und wartet in jedem Falle 5 Minuten, bevor die nächste Portion des Lösungsmittels eingeführt wird. Läuft die Flüssigkeit nach 10 Minuten Warten und Aufgießen von frischem Benzin farblos ab, so ist die Extraktion beendet. Zur Chromatographie füllt man ein Rohr mit zwei Adsorbenzien: die untere Hälfte (20 × 4,5 cm) mit Calciumhydroxyd, die obere mit Calciumcarbonat (1/5 fein, vgl. S. 39). Nachwaschen mit 500—700 cm³ Benzin, bis die folgende Aufteilung schön sichtbar wird (Abb. 35, S. 193):

Mehrere braune und gelbe, haardünne Striche, 5 rot, 5 rot: Capsorubin-ester, mehrere gelbe und rote Striche, 30 rot: Capsanthin-ester, 10 rotbraun, 1 gelb,	auf $CaCO_3$;
5 orangegelb: Zeaxanthin-ester, 2 zitronengelb, 5 orangegelb: Kryptoxanthin-ester, 2 zitronengelb, 1/2 orangegelb: γ-Carotin (?), 10 orangegelb: β-Carotin, 1/2 ockergelb: α-Carotin, 2 zitronengelb,	auf $Ca(OH)_2$.

Man zerschneidet die Säule (die drei Carotine bleiben zusammen), eluiert mit sprithaltigem Benzin, wäscht den Alkohol weg, verdünnt entsprechend und colorimetriert gegen Azobenzol (S. 92). Die Capsorubinwerte schwanken um 10—20%, sonst ist das Ergebnis recht genau.

Isolierung von Lycoxanthin $C_{40}H_{55}OH$ und Lycophyll $C_{40}H_{54}(OH)_2$, neben viel Lycopin $C_{40}H_{56}$.

17 kg frische *Solanum dulcamara*-Beeren (Bittersüß) wurden in 200-g-Anteilen mit Seesand zu einer dünnen Paste verrieben, die man absaugt und zweimal mit Alkohol auf der Nutsche abdeckt. Nun folgt die Extraktion mit peroxydfreiem Äther, bis dieser farblos tropft. Die schwachgefärbten Auszüge sind weiter verwendbar (Gesamtbedarf 15 l Äther). Man wäscht die vereinigten Extrakte spritfrei, verjagt den Äther (Vakuum, N_2), dampft den Rückstand zweimal mit Benzol ebenso ab, nimmt in 3 l warmem Benzol auf und filtriert nach dem Erkalten von Harz (ein Verseifen ist überflüssig). Das Chromatogramm (30 Rohre mit je 20 × 5,5 cm Calciumhydroxyd) entwickelt man mit viel Benzol, jedoch nur so lange, bis zwischen dem Lycopin und den höher liegenden Farbschichten eine breite weiße Zone entstanden ist. Scharfe Trennung aller Bestandteile ist hier noch unnötig.

3 braun: Autoxydiertes (ohne Spektrum),
2 tiefbraun: Autoxydiertes (ohne Spektrum),
5 rot: Lycophyll (503, 473, 444 $\mu\mu$, in Hexan),
2 braun: nicht krystallisierbar,
8 rot: Lycoxanthin (503, 473, 444 $\mu\mu$),
2 gelblichrot: unbekannt (494, 461, 433 $\mu\mu$; Rubixanthin ?),
10 gelb: nicht geprüft,
100 rot: Lycopin (503, 473, 444 $\mu\mu$),
10 gelblichrot (493, 462, 432 $\mu\mu$, γ-Carotin ?),
hellgelbes Filtrat.

Die drei roten Farbstoffe wurden einzeln herausgeschnitten und mit Benzol + Methanol (3 : 1) auf Glasnutschen eluiert. Dies gelang leicht, mit Ausnahme des Lycophylls, von welchem die Hälfte im Kalk verblieben ist. Die Eluate wurden filtriert, gewaschen, getrocknet. Es war nötig, das rohe Lycophyll noch dreimal, das Lycoxanthin zweimal, das Lycopin einmal zu chromatographieren, bis sich Homogenität einstellte. Zum Schlusse genügen für die beiden ersteren 1 bzw. 3 Rohre. Man verdampft die Endeluate nach dem Waschen und Trocknen völlig, löst den Rest in wenig heißem Benzol, setzt abs. Methanol hinzu und erhält rote Nädelchen. Ausbeute 920 mg Lycopin, 125 mg Lycoxanthin (Schmelzp. 168°, korr.) und 9 mg Lycophyll (Schmelzpunkt 179°), nämlich: 77, 61 bzw. 13% der in den Beeren colorimetrisch bestimmten Mengen (Zechmeister und Cholnoky 6).

Isolierung von Fucoxanthin $C_{40}H_{56}O_6$ aus Braunalgen (HEILBRON und PHIPERS).

50 kg *frisches*, zerhacktes Material (*Fucus vesiculosus*) wurden zweimal $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde lang in je 50 l 40proz. Aceton eingelegt (häufig umrühren). Man saugt ab und entfernt die schleimige Flüssigkeit durch scharfes Abpressen. Nun wurde das fein zermahlene Material 24 Stunden, unter gelegentlichem Rühren mit Holzgeist ausgezogen. Den filtrierten Extrakt (40 l) haben die Autoren, nach dem Verdünnen (10 l Wasser), mit Petroläther (Siedep. 40—60°) erschöpft (Extrakt „A"). Nach dem Zufügen von 1 Raumteil Wasser wurde nun die zurückgebliebene alkoholische Unterschicht ausgeäthert, der Äther gewaschen, entwässert, auf 2 l eingeengt und schließlich durch Destillation mit 1 Vol. Benzol vollends getrocknet.

Zur Chromatographie der Benzollösung (3 l) dienten 15 Rohre (50 × 5 cm), welche mit teilweise desaktiviertem (S. 42) Aluminiumoxyd[1] gefüllt waren. Entwickeln mit Benzol + Petroläther 1 : 1, zum Schlusse Auswaschen mit Petroläther (Siedepunkt 40—60°). Es erschienen drei Zonen:

Oben: tief olivgrün (verändertes Chlorophyll),
crimsonrot (enthält das Fucoxanthin),
unten: orange (Zersetzungsprodukte + wenig Fucoxanthin).

Die Mittelschicht wurde mit Methanol eluiert, die tiefrote Lösung mit 1 Vol. Wasser versetzt und zur Fernhaltung des Luftsauerstoffes mit einer dünnen Lage von Petroläther überschichtet. Der in der Grenzzone beim Stehen langsam ausgeschiedene, halbkrystallinische Farbstoff ließ sich nach dem Absaugen im Vakuum über Natriumsulfat trocknen und aus Äther + Petroläther umscheiden. Aggregate, aus tief orangeroten Nadeln bestehend, Schmelzp. 166—168° (unkorr.), Schwerpunkte in CS_2: 510, 477, 445 $\mu\mu$. Ausbeute 1—1,5 g *Fucoxanthin*; identisch mit dem Präparat von WILLSTÄTTER und PAGE.

Aus der untersten Zone wurde das Pigment in Petroläther übergeführt und auf Fullererde aufgeteilt; man erhielt zwei Komponenten: die eine identisch mit Fucoxanthin (2 mg), die andere, unkrystallisierbar, vielleicht „β-Fucoxanthin".

Aus getrocknetem, altem Ausgangsmaterial konnte *kein Fucoxanthin* erhalten werden, sondern 2 g Zeaxanthin, auf ähnlichem Wege.

[1] Allzu aktives Adsorbens vereitelt die Trennung der Bezirke.

Der *Extrakt* „*A*“ (S. 103) wurde unter Stickstoff auf 3 l eingedampft und diese Petrolätherlösung in 12 Anteilen, auf partiell desaktiviertem Aluminiumoxyd chromatographiert:

Oben: tief olivgrün (verändertes Chlorophyll),
rötlichbraun (Pektine, Fucosterin, Fucoxanthin),
crimsonrot (Fucosterin, Fucoxanthin),
weiße Zwischenzone,
bläulichgrün (Chlorophyll a),
weiße Zwischenzone,
unten: gelb (Hentriakontan, Terpene, β-Carotin).

Nachweis und Isolierung von Bakterien-carotinoiden.

Einschlägige, meist qualitative Beobachtungen stammen von PETTER (1, 2), CHARGAFF (1, 2), CHARGAFF und LEDERER, GAFFRON (1, 2), VAN NIEL und SMITH, SCHNEIDER; s. auch FISCHER und HASENKAMP 1; SIEDEL; Zusammenfassendes: WILLSTAEDT 2; vgl. Tabelle 12, S. 112.

Am weitesten sind die Untersuchungen von KARRER und SOLMSSEN (1, 2, 3, 6) gediehen, welche nachstehend referiert werden.

Aus *Thiocystis*-bakterien, die zu den roten Schwefelbakterien gehören, konnte etwas Lycopin (oder sehr ähnliches), ferner Rhodoviolascin abgeschieden werden. Das Chromatogramm der restlichen Carotinoide gleicht weitgehend dem Rhodovibrio-Pigment (s. unten).

Zu *Großversuchen* diente eine Zucht von *Rhodovibrio-bakterien* (1200 l reife Nährlösung; Angaben über die Züchtung im Original), welche vielleicht auch kleine Mengen des *Bact. chromaticum* enthielt.

Die mit Sprit verriebene und genutschte Bakterienmasse wurde im Soxhlet mit CS_2 erschöpft, der tiefrote Auszug im Vakuum verdampft und sein Rückstand mit Ligroin + Methanol aufgenommen. Durch Zusatz von wenig Wasser wurde entmischt, wobei *Bacterio-chlorophyll* nach unten, das Polyen nach oben geht. Mit beiden getrennten Schichten wiederholt man öfters die Entmischung, wäscht dann die obere Phase und verdampft sie zur Trockene. Beim Entmischen fielen an der Grenzzone rote Krystalle aus, die gesondert in heißem Benzol gelöst wurden. Die letztere Lösung dient dazu, auch den erwähnten Trockenrückstand der Ligroinlösung aufzunehmen. Die so gewonnene Flüssigkeit überführt man zweckmäßig in Ampullen, wo man sie im

Vakuum verdampft; der Rückstand wird bis zur Weiterarbeit zugeschmolzen. Man behandelt die letztere Substanz mit Petroläther, welcher einen Teil mit braunschwarzer Färbung löst und rohes *Rhodoviolascin* $C_{40}H_{54}(OCH_3)_2$ zurückläßt (aus Benzol zweimal umkrystallisiert: 20 mg; 573, 534, 496 $\mu\mu$, in CS_2).

Die Petrolätherlösung wurde auf Calciumhydroxyd aufgeteilt und mit demselben Solvent entwickelt. Das erste Chromatogramm ergibt folgende Schichtung (die Pfeile bedeuten weitere Reinigungsoperationen, die opt. Schwerpunkte beziehen sich auf CS_2):

Oben:	braun	→	Rhodovibrin	556, 517 $\mu\mu$,
	rotbraun	→	Rhodopin	547, 508 $\mu\mu$,
	lachsrot	→	Rhodoviolascin	573, 534 $\mu\mu$,
	rot	→	Rhodopurpurin	550, 511 $\mu\mu$,
	dunkelgelb	→	β-Carotin (?)	521, 485 $\mu\mu$,
unten:	hellgelb	→	Flavorhodin	502, 472 $\mu\mu$.

Das *Rhodopin* wurde mittels Petroläther + Methanol, eventuell unter Benzolzusatz, eluiert, die Flüssigkeit gewaschen und eingedampft. Umkrystallisieren aus Ligroin + wenig Benzol, dann aus abs. Alkohol. Das Rhodopin muß durch wiederholte Adsorption auf $Ca(OH)_2$ gereinigt werden (Entwickeln mit Petroläther + Benzol 1:1 oder 1:2). Trennt man selbst eine sehr weitgehend gereinigte Rhodopinzone willkürlich in drei gleiche Teile, so liefert das oberste Drittel *Rhodovibrin* (Krystalldrusen, Schmelzp. 168°), während das unterste Drittel die bisher reinste Rhodopinfraktion ergibt (Schmelzp. ebenfalls 168°, Drusen).

Das *Rhodopurpurin* wurde aus der betreffenden Zone durch Eluieren, Überführen in Petroläther und Einengen erhalten. Nadeln, Schmelzp. 161—162°.

B. Beispiele für die Verarbeitung von tierischen Carotinoiden.

(Vgl. auch Tabelle 13, S. 118 und 14, S. 120.)

Bestimmung des Lipochroms in der menschlichen Leber.

Das frische, gehackte und durch wiederholtes Einlegen in Weingeist entwässerte Material gibt über Nacht seine Carotinoide größtenteils an kalten Äther ab; der Rest wird der getrockneten und gemahlenen Masse mit dem gleichen Solvent leicht entzogen. Man verseift die Lösung zweimal mit konz. methylalkoholischem

Tabelle 11. Beispiele für die Chromatographie von Polyenen aus höheren Pflanzen.
(Zunächst werden Polyen-kohlenwasserstoffe, dann Polyen-alkohole, Polyen-ketone und zum Schluß Farbstoffe mit weniger als C_{40} angeführt.)

Pflanze	Organ	Isoliert (nachgewiesen)	Adsorbens	Lösungsmittel	Literatur
Daucus carota (Mohrrübe)	Wurzel	α-, β-Carotin	Fasertonerde	Benzin	KUHN und LEDERER (1)
Daucus carota (Mohrrübe)	Wurzel	α-, β-Carotin	$Ca(OH)_2$	Petroläther	KARRER und WALKER (1)
Daucus carota (Mohrrübe)	Wurzel	α-, β-Carotin (unbekanntes Polyen)	Fasertonerde	Petroläther	KARRER, SCHÖPP und MORF
Daucus carota (Mohrrübe)	Wurzel	α-, β-, γ-Carotin	Al_2O_3	Benzin, Benzol	KUHN und BROCKMANN (7, 8)
Daucus carota (Mohrrübe)	Wurzel, Blatt	α-, β-Carotin	MgO	Petroläther	STRAIN (1, 2)
Daucus carota (Mohrrübe)	Blatt	(Carotine)	Norit A	Dichlormethan	MACKINNEY und MILNER
Aesculus hippocastanum (Roßkastanie)	grünes und herbstliches Blatt	β-Carotin (unbekannte Polyene)	$Ca(OH)_2$	Petroläther	KARRER und WALKER (2)
Urtica dioica (Brennessel)	Blatt	α-, β-Carotin	$Ca(OH)_2$	Benzin	KARRER und SCHLIENTZ
Capsicum annuum (Paprika)	Frucht	α-Carotin	$Ca(OH)_2$	Benzin	KARRER und SCHLIENTZ

Spinacia oleracea (Spinat)	Blatt	α-, β-Carotin	$Ca(OH)_2$	Benzin	KARRER und SCHLIENTZ
59 verschiedene Pflanzen	Blatt	α-, β-Carotin	MgO	Petroläther	MACKINNEY (1)
Palme	Öl	α-, β-Carotin	MgO	Petroläther	STRAIN (1, 2)
Gonocaryum pyriforme	Frucht	α-, β-, γ-Carotin, Lycopin	Al_2O_3 Fasertonerde	Petroläther Benzin	WINTERSTEIN (2,3)
Prunus armeniaca (Aprikose)	Frucht	β-Carotin, Lycopin, (γ-Carotin)	Al_2O_3	Benzin	BROCKMANN (1)
Tagetes erecta	Blüte	(Lycopin), (Carotin)	$CaCO_3$	Petroläther	COWARD
Citrus grandis (Pink grapefruits)	Frucht	β-Carotin, Lycopin	Fasertonerde	Benzin	MATLACK
Solanum dulcamara (Bittersüß)	Beere	Lycopin, Lycophyll, Lycoxanthin	$Ca(OH)_2$	Benzol	ZECHMEISTER und CHOLNOKY (6)
Tropaeolum, Kirsche, Kastanie	grüne und gelbe Blätter	(Xanthophyll), (Xanthophyllester), (Carotin)	$CaCO_3$	Benzin	KUHN und BROCKMANN (3)
Physalis Franchetti (Judenkirsche)	grüne, gelbe und rote Kelchblätter; alter Kelch; Fruchtfleisch; grüne und vergilbte Blätter	(Xanthophyll), (Physalien), (Carotin)	$CaCO_3$	Benzin	KUHN und BROCKMANN (3)

Pflanze	Organ	Isoliert (nachgewiesen)	Adsorbens	Lösungsmittel	Literatur
Aesculus hippocastanum (Roßkastanie)	gelbe Blätter	β-Carotin, ein Xanthophyll (unbekannte Farbstoffe)	$Ca(OH)_2$	Petroläther	KARRER und WALKER (2)
Citrus aurantium (Orange)	Schale und Fruchtfleisch	„Carotin" und „Xanthophyll"			VERMAST
Weizen	Korn	„Xanthophyll"	Al_2O_3	Petroläther	MALMBERG und EULER
Weizen	(Keimöl)	Lutein, Kryptoxanthin	Al_2O_3	Petroläther	DRUMMOND, SINGER und MAC WALTER
Lycopersicum esculentum (Tomate)	Frucht	Lycopin, Carotine, Zeaxanthin, Lutein	Al_2O_3 $CaCO_3$	Benzin	KUHN und GRUNDMANN (1)
Physalis Franchetti	Kelchblatt, Beere	Zeaxanthin, Kryptoxanthin (verestert)	Al_2O_3	Benzol + Benzin	KUHN und GRUNDMANN (3)
Zea mays (Mais)	Korn	Zeaxanthin, Kryptoxanthin	Al_2O_3	Benzol + Benzin	KUHN und GRUNDMANN (5)
Rosa rugosa	Frucht	Rubixanthin, („Xanthophylle", Lycopin, α-, β-, γ-Carotin)	Al_2O_3	Benzol + Benzin	WILLSTAEDT (5)

Cuscuta subinclusa, C. salina	Blüte	Rubixanthin, Lycopin, α-, β-, γ-Carotin	MgO	Petroläther	MACKINNEY (2)
Leontodon autumnalis	Blütenblätter	Lutein, Taraxanthin	$CaCO_3$		KUHN und LEDERER (5)
Rosa rubinosa	Frucht	Rubixanthin (α-, β-Carotin, Zeaxanthin, Lutein, Taraxanthin)	Al_2O_3	Benzol, Benzin	KUHN und GRUNDMANN (4)
Aesculus hippocastanum	Blatt	Lutein, Violaxanthin	$CaCO_3$	CS_2	KUHN, WINTERSTEIN und LEDERER
Cucurbita maxima (Riesenkürbis)	Frucht	α-, β-Carotin, Lutein, Violaxanthin	$Ca(OH)_2$ $CaCO_3$	Benzin, CS_2	ZECHMEISTER und TUZSON (3)
Rhabarber, Platane, Pappel, Buche, Ahorn, Birke, Trauerweide	grüne und gelbe Laubblätter	(Violaxanthin, Zeaxanthin, Lutein und deren Ester, Carotin)	$CaCO_3$	Benzin	KUHN und BROCKMANN (3)
Helianthus annuus (Sonnenblume)	Blütenblatt	Lutein, Taraxanthin (Carotin, Kryptoxanthin, Violaxanthin?)	$CaCO_3$	CS_2	ZECHMEISTER und TUZSON (2)
Taraxacum officinale (Löwenzahn)	Blütenblatt	Taraxanthin, Lutein (Violaxanthin?)	$CaCO_3$	Benzin	KUHN und LEDERER (2)

Pflanze	Organ	Isoliert (nachgewiesen)	Adsorbens	Lösungsmittel	Literatur
Ranunculus acer (Hahnenfuß)	Blütenblatt	Lutein, Taraxanthin, Violaxanthin, Flavoxanthin (β-Xanthophyll?)	$CaCO_3$	Benzin	KUHN und BROCKMANN (5)
Citrus madurensis (Mandarine)	Frucht	β-Carotin, Kryptoxanthin, Lutein (Violaxanthin?)	$CaCO_3$ $Ca(OH)_2$	Benzin, CS_2	ZECHMEISTER und TUZSON (13)
Diospyros costata	Frucht	(α-), β-Carotin, Lycopin, Zea-, Krypto- und Violaxanthin	Al_2O_3 $CaCO_3$	Petroläther, CS_2	SCHÖN
Arbutus unedo	Frucht	α- und β-Carotin, (Lycopin), Krypto-, Viola-, Zeaxanthin, Lutein	Al_2O_3	Petroläther	SCHÖN
Cucurbita pepo (Kürbis)	Blütenblatt	Petaloxanthin, Kryptoxanthin, Zeaxanthin, Lutein, Carotin	$CaCO_3$	CS_2	ZECHMEISTER, BÉRES und UJHELYI (1, 2)
Thuja usw.	Blatt	(Rhodoxanthin, Carotin, Xanthophyll)	$CaCO_3$	Benzin, CS_2	LIPMAA

Taxus baccata (Eibe)	Arillus	Rhodoxanthin, Lycopin, β-Carotin, Zeaxanthin	Al_2O_3	Benzol + Benzin	KUHN und BROCKMANN (9)
Capsicum annuum (Paprika)	Fruchthaut	Capsanthin, Capsorubin, Zeaxanthin, Lutein, Kryptoxanthin, α-, β-Carotin	$CaCO_3$ $Ca(OH)_2$	CS_2, Benzin	ZECHMEISTER und CHOLNOKY (3, 4)
Lilium tigrinum	Staubbeutel	Capsanthin, Anteraxanthin	$Ca(OH)_2$	Benzol	KARRER und OSWALD (1)
Citrus aurantium (Orange)	Frucht	Citraurin, Violaxanthin, Lutein, Zeaxanthin, Kryptoxanthin (Carotin)	$CaCO_3$ $Ca(OH)_2$	CS_2, Benzin	ZECHMEISTER und TUZSON (14)
Crocus sativus (Safran)	Blütenblatt	Crocetin, α-, β-, γ-Carotin, Lycopin, Zeaxanthin	Al_2O_3	Benzin	KUHN und WINTERSTEIN (4)
Escobedia scabrifolia u. *E. linearis* (Azafranillo)	Wurzel	Azafrin	$CaCO_3$	Benzol, Benzin	KUHN und DEUTSCH
Bixa orellana (Orlean)	Samen	„Bixol"	Al_2O_3		BACHSTEZ und CAVALLINI
Gingko biloba	gelbe Herbstblätter	(unbekannte Polyene)	$Ca(OH)_2$	Petroläther	KARRER und WALKER (2)
Ulmus campestris	grüne Herbstblätter	(unbekannte Polyene)	$Ca(OH)_2$	Petroläther	KARRER und WALKER (2)

Tabelle 12. Beispiele für die Chromatographie von Algen-, Pilz- und Bakterien-Polyenen.

Ausgangsmaterial	Isoliert (nachgewiesen)	Adsorbens	Lösungsmittel	Literatur
Fucus vesiculosus	Fucoxanthin, Zeaxanthin, β-Carotin	Al_2O_3	Petroläther	HEILBRON und PHIPERS
Cladophora sauteri *Nitella opaca*	β-Carotin, Lutein, Taraxanthin	$CaCO_3$, Al_2O_3	Benzol, Benzin	HEILBRON, PARRY und PHIPERS
Oscillatoria rubrescens	Myxoxanthin, Myxoxanthophyll	$CaCO_3$, Al_2O_3	Chloroform, Benzin	HEILBRON, und LYTHGOE
Oedogonium	α-, β-Carotin, Lutein, Taraxanthin	$CaCO_3$, Al_2O_3	Benzol, Benzin	HEILBRON, PARRY und PHIPERS
Rhodymenia palmata	β-Carotin, Lutein, Taraxanthin	$CaCO_3$, Al_2O_3	Benzol, Benzin	HEILBRON, PARRY und PHIPERS
Euglena heliorubescens	Euglenarhodon, (β-Carotin, Lutein, Zeaxanthin, verestert)	Al_2O_3	Äther	TISCHER (1) (Betr. *Trentepohlia* s. TISCHER 2)
Torula rubra (rote Hefe)	Torulen, β-Carotin	Al_2O_3	Benzin	LEDERER (4)
Spirillum rubrum	unbekanntes Polyen, Spirilloxanthin	MgO, Silicaerde	Dichloräthan	VAN NIEL und SMITH
Sarcina lutea	(Sarcinin, Xanthophyll)	Al_2O_3	Benzin	CHARGAFF und DIERYCK

Sarcina lutea	(Sarcinin, ein Xanthophyll)	Fasertonerde	Benzin	CHARGAFF (1)
Sarcina aurantiaca	β-Carotin, Zeaxanthin	Al_2O_3	Benzin	CHARGAFF (1)
Staphylococcus aureus	Zeaxanthin	Al_2O_3	Benzin	CHARGAFF (1)
Mycobacterium phlei	β- und γ-Carotin, Lutein	Al_2O_3	Benzin	CHARGAFF (1)
Mycobacterium phlei	α-, β-Carotin, Kryptoxanthin (Lutein-, Zeaxanthin- und Azafrinester)	MgO	Petroläther	INGRAHAM und STEENBOCK
Rhodovibrio-bakterien	Rhodoviolascin, Rhodopin, Rhodopurpurin, Flavorhodin, β-Carotin, Lycopin, Rhodovibrin	$Ca(OH)_2$	Petroläther	KARRER und SOLMSSEN (1, 2, 3, 6)
Bacterium halobium	α- und β-Bacterioruberin	$CaCO_3$	CS_2	PETTER (1, 2)
Thiocystis-bakterien	Lycopin, Rhodoviolascin	$Ca(OH)_2$	Petroläther	KARRER und SOLMSSEN (1, 2, 3, 6)
Bacillus Lombardo Pellegrini	(β- und γ-Carotin)	Al_2O_3, $CaCO_3$	Benzin usw.	CHARGAFF und LEDERER
Bacillus Grassbergeri	(β- und γ-Carotin, Lycopin, Xanthophyll)	Al_2O_3, $CaCO_3$	Benzol, Benzin	CHARGAFF und LEDERER

Kali (je 16—20 Stunden, unter Stickstoff), wäscht gut aus und löst den Abdampfrückstand der getrockneten Ätherschicht in Benzin. Nun folgt eine Entmischung mit Methanol, worauf die hypophasischen Bestandteile mit Hilfe von Wasser gleichfalls in Benzin übergeführt werden. Die beiden Benzinlösungen lassen sich in der Calciumhydroxyd-Säule aufteilen, die Einzelringe werden mit holzgeisthaltigem Äther eluiert. Den Abdampfrückstand des getrockneten Äthers nimmt man jeweils in Benzin auf und vergleicht seine Farbstärke mit Azobenzol (S. 92).

Der epiphasische Anteil zerfällt meist in zwei Ringe: oben Lycopin, darunter Carotin; auch das Chromatogramm des Hypophasischen ist im wesentlichen zweischichtig: oben Xanthophyll, unten unbekannte Zersetzungsprodukte. Eine spektroskopische Kontrolle wird erleichtert, wenn man die betreffende Farbschicht nochmals chromatographiert, die Bänder werden dann schärfer sichtbar. Gefunden z. B.: 1,6 mg Carotin, je 0,5 mg Lycopin bzw. Xanthophyll und 0,05 mg unbekanntes Polyen pro Kilogramm Frischleber (ZECHMEISTER und TUZSON 9).

Jüngst haben WILLSTAEDT und LINDQUIST durch Aufteilung in einer Aluminiumoxyd-Säule, nach einer grundsätzlich ähnlichen Methodik, Carotin, Lycopin, Zeaxanthin und Xanthophyll (vielleicht auch Violaxanthin) in der menschlichen Leber ermittelt. Daneben fanden sich unbekannte, farbige Komponenten vor (Abbauprodukte von Polyenen).

Chromatographie des Blutserum-lipochroms.

Im Blutserum zahlreicher Tiere sind Carotinoide enthalten, welche, nach Freilegung aus einer Paarung mit Eiweiß, adsorptionsanalytisch aufgeteilt und bestimmt werden können. Die ältesten, wichtigen Versuche dieser Art stammen von PALMER und ECKLES und betreffen das zirkulierende Lipochrom der Kuh, in welchem GILLAM und EL RIDI (1, 2) neben viel Carotin auch etwas Lutein und Kryptoxanthin (sowie Vitamin A) feststellten. Im Pferdeserum wurde chromatographisch vorwiegend Carotin nachgewiesen, nebst farbigen Abbauprodukten der Nahrungspolyene (ZECHMEISTER und TUZSON 10).

Aufteilung der menschlichen Blutserum-carotinoide. Die in der Literatur zuweilen vorgenommene Auswertung des ätherlöslichen

Serumfarbstoffes als „Carotin“ ist nach neueren Untersuchungen (DÁNIEL und SCHEFF; DÁNIEL und BÉRES) auch hier unrichtig. Vielmehr muß mit dem Gesamtpolyen eine Entmischung und, namentlich wenn das farbkräftige Lycopin von der Diät nicht ausgeschlossen war, auch die *Chromatographie* vorgenommen werden, da sonst die Provitamin-A-Werte viel zu hoch ausfallen. 3 l menschliches Blutserum wurden mit 1 Raumteil Alkohol gefällt und der abzentrifugierte Niederschlag mit peroxydfreiem Äther erschöpft. Man verseifte den Extrakt mit methanolischem Kali während 2 Tage, unter N_2 und entmischte das in Benzin übergeführte Pigment mit 90proz. Holzgeist. Das Epiphasische wurde (nach dem Ausfrieren von viel Cholesterin) auf Calciumhydroxyd chromatographiert, mit nachfolgender Mikrocolorimetrie der Bestandteile.

Oben: gelblichbraun: unbekannt (0,3 mg, als „Carotin“ berechnet),
rosafarbig: Lycopin (0,15 mg),
hellgelb: unbekannt (0,08 mg),
unten: orangegelb: β- (und α-) Carotin (0,28 mg).
Der hypophasische Anteil enthielt 0,84 mg „Lutein“.

Es folgt aus diesen Angaben, daß, falls bei klinischen Untersuchungen nur eine, zur Adsorptionsanalyse unzureichende Blutmenge verfügbar ist, genaue Carotinwerte nicht ermittelt werden können.

Nach WILLSTAEDT und LINDQUIST genügt hierzu 140—250 cm^3 Blutserum. Die Autoren dampfen die Ätherextrakte im N_2-Strom ein, nehmen den sterinreichen Rückstand in Petroläther auf und schütteln die Lösung mit 90proz. Methanol aus. Die Chromatographie beider Fraktionen wird aus Benzin + Benzol auf Aluminiumoxyd vorgenommen. Elution und Mikrocolorimetrie der abgetrennten Komponenten, wie üblich.

Im epiphasischen Anteil wurde Carotin (Menge etwa wie oben verzeichnet), eventuell auch Lycopin gefunden. Zwischen den beiden Schichten liegen noch zwei unbekannte Farbstoffe (Abbauprodukte) und bilden einen rosa bzw. einen braungelben Ring (in Petroläther 498, 468, 442 bzw. 478, 459 $\mu\mu$). Die vollständige Trennung gelingt hier erst bei wiederholter Chromatographie und energischem Entwickeln mit Benzol + Benzin (4:1). Im hypophasischen Anteil wurden regelmäßig Zeaxanthin und Xanthophyll ermittelt.

Die chromatographische Bestimmung der *Serum-carotinoide neben Bilirubin* s. unter Gallenfarbstoffe (S. 85; SÜLLMANN, SZÉCSÉNYI-NAGY und VERZÁR).

Isolierung von Carotin aus Pferdefett.

2 kg zerhacktes Material wurden in eine Lösung von 500 g KOH in 3 l 96proz. Alkohol gelegt und 15 Minuten auf 50° erwärmt. Man versetzt die klare, 25° warme Lösung mit 8 l Äther und dann anteilsweise, vorsichtig mit Wasser, gerade bis sich die Schichten trennen. Die abgelassene untere Phase wird behutsam, ohne stark zu schwenken, mit Äther extrahiert und der Auszug zur ätherischen Hauptlösung gefügt, worauf man dieselbe einen Tag über konz. methanolischem Kali stehen läßt. Nun wurde das Pigment mit Wasser wieder in Äther getrieben, der letztere alkalifrei gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und verdampft. Man verteilt den Rückstand zwischen Petroläther (Siedep. 30—60°) und ebensoviel 90proz. Methanol, wobei die Hauptmenge des Farbstoffes sich epiphasisch verhält.

Die gewaschene und getrocknete Petrolätherlösung wurde nun auf Calciumhydroxyd (18×4 cm) chromatographiert. In der oberen Hälfte der Säule häufen sich farblose Begleiter an; der Farbstoff dringt beim Nachwaschen mit Benzin tiefer vor und beginnt, nachdem die halbe Höhe passiert ist, in zwei Farbringe zu zerfallen. Oben: 10 mm dick, orangegelb, β-Carotin; tiefer: (5 mm, zitronengelb), α-Carotin. Man eluiert die Hauptschicht mit methanolhaltigem Äther, wäscht, trocknet und dampft ab. Der Rückstand lieferte, aus 0,3 cm³ Benzol und einigen Kubikzentimetern Methanol umgeschieden, 3 mg β-Carotin = 25% der im Fett colorimetrisch ermittelten Menge (ZECHMEISTER und TUZSON 4).

Carotin und Xanthophyll (Lutein) aus Pferdemist.

2 kg frisches Material wurden 3 Stunden unter 3 l 5proz. alkoholischem Kali stehen gelassen, koliert, mit Alkohol gewaschen und mit 3 l Äther gründlich nachextrahiert. Den aus dem Alkali in Äther getriebenen Farbstoff hat man mit dem Ätherauszug vereinigt und dessen Abdampfrückstand zwischen a) Benzin und b) 90proz. Methanol verteilt.

a) Die Benzinlösung wurde zweimal auf $Ca(OH)_2$ chromatographiert. Abgesehen von etwas α-Carotin, erschien eine breite,

gelbe Zone, aus der sich das *β-Carotin* mit methanolhaltigem Äther eluieren ließ. Zum Abdampfrückstand des Eluates fügte man etwas Benzol, dann Holzgeist und wenig abs. Alkohol. Von Sterinfraktionen wurde nun filtriert und das Carotin im Eisschrank auskrystallisiert. Ausbeute 8,6 mg.

b) Die Polyen-alkohole führt man aus der Methanolschicht in CS_2 über und gießt die Lösung auf $CaCO_3$. Der Hauptanteil bildete einen tief-orangegelben Bezirk, mit dem die Chromatographie wiederholt wurde. Man eluiert wie oben, nimmt den Trockenrückstand des Äthers in 1 cm^3 Chloroform auf und setzt viel Petroläther hinzu. Über Nacht, bei 0^0, schieden sich 32 mg Xanthophyll aus. Man löst es in viel heißem Methanol, filtriert bei 20^0 von farblosen Begleitern, reinigt den Farbstoff erforderlichenfalls in der Carbonat-Säule und scheidet ihn schließlich aus Chloroform und Petroläther um. Ausbeuten 50—60% des colorimetrisch ermittelten Betrages (ZECHMEISTER und TUZSON 5).

Isolierung von Actinio-erythrin aus Actinia equina (FABRE und LEDERER).

Bei der nachfolgenden Vorschrift handelt es sich um die Abscheidung eines tierischen Polyens mit Esterstruktur. Legt man die zerhackten Tiere (rote Varietät) wiederholt in Aceton ein, so entsteht eine rotviolette Flüssigkeit, deren Pigment mit Wasser in Petroläther übergeführt wird. Nun schüttelt man die Lösung mit Wasser, dann mit 90proz. Methylalkohol (bleibt farblos) und wäscht mit Wasser den Alkoholgehalt weg. Von den im Eisschrank beim Stehen sich abgeschiedenen Wassertröpfchen wird dekantiert und die Lösung auf eine Calciumcarbonat-Säule gegossen. Der oben festgehaltene, rotviolette Bezirk wandert beim Nachwaschen mit Petroläther langsam nach unten und zerfällt zugleich in drei Schichten. Man eluiert die Hauptzone mit methanolhaltigem Petroläther (1 : 100), filtriert, dampft im Vakuum ein und nimmt den dunklen, mikrokrystallinischen Rückstand in abs. Alkohol auf. Nach dem Zutropfen von Wasser bis zur beginnenden Trübung, scheidet die Flüssigkeit im Eisschrank violettgraue Nadeln ab. Ausbeute aus 30 Tieren: 1,5 mg Actinioerythrin (etwa 30% des Farbstoffgehaltes).

Trennung von Carotinoiden und Vitamin A: S. 179.

Tabelle 13. Beispiele für die Chromatographie von Polyenen des menschlichen Organismus.

Rohstoff	Isoliert (nachgewiesen)	Adsorbens	Lösungsmittel	Literatur
Blutserum	(Lycopin, Carotin, Xanthophylle)	$Ca(OH)_2$	Benzin	DÁNIEL und SCHEFF; DÁNIEL und BÉRES
Blutserum	(Carotine, Xanthophylle)	Al_2O_3	Benzin	SÜLLMANN, SZÉCSÉNYI-NAGY und VERZÁR
Blutserum	(Carotin, Lycopin, Zeaxanthin, unbekannte Xanthophylle)	Al_2O_3	Benzin	WILLSTAEDT und LINDQUIST
Leber	(Carotin), (Lycopin), (Xanthophyll)	$Ca(OH)_2$	Benzin	ZECHMEISTER und TUZSON (9)
Leber	(Carotin, Lycopin, Zeaxanthin, Lutein, Violaxanthin)	Al_2O_3	Benzin	WILLSTAEDT und LINDQUIST
Depotfett	β-Carotin (Lycopin, Capsanthin, Xanthophyll)	$Ca(OH)_2$	Benzin	ZECHMEISTER und TUZSON (8)
Placenta	(Xanthophylle, Xanthophyllester, Carotin)	$CaCO_3$	Benzin	KUHN und BROCKMANN (3)

C. Beispiele für die Verarbeitung von künstlichen Umwandlungsprodukten der Carotinoide.

(Vgl. auch Tabelle 15, S. 128.)

Trennung von Carotin und Isocarotin.

Das unbekannt konstituierte Kunstprodukt Isocarotin $C_{40}H_{56}$ (Literaturzusammenstellung bei ZECHMEISTER 1, dort S. 147), welches z. B. durch Jodieren und Regenerieren mit Thiosulfat aus dem natürlichen Carotin entsteht, kann nach KUHN und LEDERER (4) von β-Carotin in einer aus 1 Teil Fasertonerde und 2—4 Teilen Al_2O_3(Merck) bereiteten Säule getrennt werden (Benzin). Das

Isocarotin zeigt die stärkere Adsorbierbarkeit und verhält sich dem Lycopin recht ähnlich, während β-Carotin eine tiefere Lage einnimmt.

β-Carotin-monoxyd (Euler, Karrer und Walker).

Eine Lösung von 0,536 g Carotin in 100 cm³ Chloroform wurde mit zirka 5 cm³ Benzopersäurelösung (= 0,166 g akt. O) versetzt und 36 Stunden im Dunkeln stehengelassen. Die bräunlichrot gewordene Flüssigkeit hat man zweimal mit sehr verdünntem Bicarbonat geschüttelt, durch mehrere Faltenfilter gegossen (Trocknung) und im Vakuum abgedampft. Man nimmt den Rückstand mit Benzol auf, versetzt die Flüssigkeit mit Methanol bis zur ersten Trübung, saugt die abgeschiedenen Krystalle nach zwölfstündigem Stehen bei 0° ab, wäscht mit Methanol nach, löst sie in 50 cm³ Petroläther und chromatographiert auf Fasertonerde:

10 rötlichgelb: nicht krystallisierbar,
45 gelb: Carotin-monoxyd,
25 lachsrot (wenig Isocarotin? 542, 503, 472 μμ, in CS_2),
gelbrot, auswaschbar (Filtrat).

CH_3 CH_3
C
CH_2 C—CH= . . .
>O
CH_2 C—CH_3
CH_2

Wahrscheinliches Ringsystem des β-Carotin-monoxyds.

Die 45-mm-Zone wurde mit 90proz. Methanol eluiert, ihr Farbstoff in Petroläther übergeführt und der Abdampfrückstand des letzteren aus Benzol + Methanol, dann mehrmals aus Petroläther umkrystallisiert. Ausbeute 30—70 mg Carotinoxyd $C_{40}H_{56}O$, Schmelzp. 160—161°; in CS_2: 486, 456, (427) μμ.

Darstellung von β-Oxycarotin, β-Carotinon und Semi-β-carotinon aus β-Carotin

(Kuhn und Brockmann 6, 10, 13, 14; Formeln: S. 28).

Man löst 3 g Carotin in Portionen von 50 mg in 15 cm³ Benzol, verdünnt mit 25 cm³ Eisessig und versetzt mit 3 cm³ 0,1n-Chromsäure, tropfenweise, unter starkem Rühren. Man fügt 1 Vol. Benzin zu (Siedep. 70—80°), gießt die Flüssigkeit in Wasser, wäscht die Oberschicht aus, trocknet und bringt die Lösung (Benzol + Benzin 1 : 1) auf Al_2O_3 (Merck, nach Brockmann). Durch Entwickeln mit reinem Benzol wurde das folgende Chromatogramm erhalten (60 Rohre):

Tabelle 14. Beispiele für die Chromatographie von tierischen Polyenen.

Tier	Organ usw.	Isoliert (nachgewiesen)	Adsorbens	Lösungsmittel	Literatur
Kuh	Blutserum	(Carotin, Xanthophyll)	$CaCO_3$	CS_2	PALMER und ECKLES
Kuh	Talg	Carotin	$Ca(OH)_2$	Benzin	ZECHMEISTER und TUZSON (1)
Kuh	Corpus luteum	(α-, β-Carotin)	$CaCO_3$	Benzin	KARRER und SCHLIENTZ
Kuh	Corpus rubrum	β-Carotin	Fasertonerde + Al_2O_3		KUHN und BROCKMANN (3)
Kuh	Milch	(Lycopin, Carotin)	Al_2O_3	Benzin + Benzol	VAN WIJNGAARDEN
Kuh	Butter	Xanthophyll (Lutein), Zeaxanthin, Carotin, (Vitamin A)	$CaCO_3$, Al_2O_3	Petroläther	KARRER und SCHÖPP (1)
Kuh	Butter	(Carotin, Lycopin, Xanthophyll, Kryptoxanthin)	Al_2O_3	Benzin	GILLAM und HEILBRON (1)
Kuh	Butter	(Carotin, Xanthophyll)	$CaCO_3$	CS_2	PALMER und ECKLES
Kuh	Mist	(Carotin, Xanthophyll)	$CaCO_3$	CS_2	PALMER und ECKLES

Pferd	Blutserum, Leber, Fettgewebe, Niere, Nebenniere, Lunge, Milz	(Carotin, Abbauprodukte)	$Ca(OH)_2$	Benzin	ZECHMEISTER und TUZSON (10)
Pferd	Fett	(α-), β-Carotin	$Ca(OH)_2$	Benzin	Dieselben (4)
Pferd	Mist	(α-Carotin), β-Carotin	$CaCO_3$ $Ca(OH)_2$	Benzin CS_2	Dieselben (5)
Schwein	Leber	(Ergebnis negativ)	$Ca(OH)_2$	Benzin	Dieselben (12)
Ratte	Mist	(Physalien, Zeaxanthin)	$CaCO_3$	Benzin	KUHN und BROCKMANN (3)
Huhn	Fett	(Carotin, Violaxanthin) Xanthophyll	$CaCO_3$	CS_2	ZECHMEISTER und TUZSON (4)
Huhn	Eidotter	Lutein, Zeaxanthin	$CaCO_3$	CS_2	KUHN, WINTERSTEIN und LEDERER
Huhn	Eidotter	(Lutein, verestertes Lutein, Carotin)	$CaCO_3$	Benzin	KUHN und BROCKMANN (3)
Huhn	Eidotter	(Carotin, Kryptoxanthin, Xanthophylle, Vitamin A)	$CaCO_3$, Al_2O_3	Benzin	GILLAM und HEILBRON (2)

Tier	Organ usw.	Isoliert (nachgewiesen)	Adsorbens	Lösungsmittel	Literatur
Huhn	Eidotter	Lutein, Zeaxanthin	$MgCO_3$		EULER und GARD
Huhn, Gans, Ente	Tarsalhaut	(Lutein-ester, „Kanarien-xanthophyll“)	$CaCO_3$	Benzin	BROCKMANN und VÖLKER
Gans	Schnabelepidermis	(Lutein-ester, „Kanarien-Xanthophyll“, Carotin)	$CaCO_3$	Benzin	BROCKMANN und VÖLKER
Haustaube	Tarsalhaut	(Zeaxanthin, Lutein, rote Zersetzungsprodukte)	$CaCO_3$	Benzin	BROCKMANN und VÖLKER
Zahlreiche Vogelarten	Gefieder	(Lutein, Zeaxanthin, „Kanarienxanthophyll“, Picofulvin, Zersetzungsprodukte)	$CaCO_3$	Benzin	BROCKMANN und VÖLKER; VÖLKER
Rana esculenta (Wasserfrosch)	Leber, Haut, Ovarien, Fettkörper	α-, β-Carotin, Lutein, Zeaxanthin	$Ca(OH)_2$	Benzin	ZECHMEISTER und TUZSON (11)

Hippoglossus hippoglossus (Heilbutt)	Rogen	(Xanthophyll, Zeaxanthin)	$CaCO_3$	CS_2	EULER, GARD und HELLSTRÖM
Lophius piscatorius (Seeteufel)	Leber	(unbekannte Carotinoide)	$CaCO_3$	CS_2	SÖRENSEN (2)
Lophius piscatorius (Seeteufel)	Leberöl	(Astacin, Taraxanthin?)	Al_2O_3	Benzin	BURKHARDT, HEILBRON, JACKSON, PARRY und LOVERN
Nephrops norvegicus (Steingarnele)	Gesamttier	Astacin	Al_2O_3	Benzin	BURKHARDT, HEILBRON, JACKSON, PARRY und LOVERN
Wal	Öl	Astacin	Al_2O_3, Fullererde	Benzin	BURKHARDT, HEILBRON, JACKSON, PARRY und LOVERN
Orthagoriscus mola (Klumpfisch)	Leber	(α- und β-Carotin, unbekannte Polyene)	Al_2O_3	Benzin	SÖRENSEN (1)
Salmo salar (Lachs)	Muskel	Salmensäure	Al_2O_3	Benzin	EMMERIE, VAN EEKELEN, JOSEPHY und WOLFF
Hypsypops rubicunda (ein Meeresgoldfisch)		Xanthophyll	$CaCO_3$	Ligroin	FOX (1)

Tier	Organ usw.	Isoliert (nachgewiesen)	Adsorbens	Lösungsmittel	Literatur
Botryllus Schlosseri		Pectenoxanthin, Capsorubin, Capsanthin, Lycopin, β-Carotin	$CaCO_3$	Benzin + Benzol	LEDERER (7)
Dendrodoa grossularia		Astacinester	$CaCO_3$	Benzin + Benzol	LEDERER (7)
Halocynthia papillosa (Cynthia pap.)		Astacinester, „Cynthiaxanthin"	$CaCO_3$	Benzin + Benzol	LEDERER (7)
Maja squinado (Seespinne)	Eier	(„Vitellorubin", Carotin)	$CaCO_3$	Benzin	DHÉRÉ und VEGEZZI; vgl. VEGEZZI
Mytilus californianus (kalifornische Miesmuschel)	Faeces	(Carotin, Xanthophyll)	$CaCO_3$	Petroläther	FOX (2)
Pecten maximus (Kammuschel)	Sexualorgan	Pectenoxanthin	$CaCO_3$		LEDERER (8)
Cardium tuberculatum (Herzmuschel)		(unbekannte Polyene)	$Ca(OH)_2$	Benzol	KARRER und SOLMSSEN (5)

Echinus esculentus (Seeigel)	Sexualdrüsen	Echinenon	$Ca(OH)_2$ Al_2O_3	Benzin	LEDERER (10); LEDERER u. MOORE
Echinus esculentus (Seeigel)	ganzes Tier	Pentaxanthin	Al_2O_3, $CaCO_3$	Benzol	LEDERER (8)
Tealia felina		Actinio-erythrin(?)-ester (Carotin)	Al_2O_3, $CaCO_3$	Benzol	HEILBRON, JACKSON und JONES
Actinoloba dianthus (Seenelke)		neue Polyensäure	$Ca(OH)_2$	Petroläther	HEILBRON, JACKSON und JONES
Anemonia sulcata (Seerose)		Sulcatoxanthin (Carotin)	Al_2O_3	Benzol	HEILBRON, JACKSON und JONES
Actinia equina		Actinio-erythrin	$CaCO_3$	Benzin	FABRE und LEDERER; LEDERER (5)
Actinia equina		Actinio-erythrin	Al_2O_3	Petroläther	HEILBRON, JACKSON und JONES
Axinella cristagalli		Astacin (unbekannte Farbstoffe)	$CaCO_3$	Benzol	KARRER und SOLMSSEN (5)
Coccinella septempunctata	Flügeldecke	(Lycopin, Carotine)	Al_2O_3	Benzin	LEDERER (6)
Pyrrhocoris apterus	Flügeldecke	(Lycopin)	Al_2O_3	Benzin	LEDERER (6)
Oedipoda miniata	Flügeldecke	(β-Carotin)	CaO	Benzin	LEDERER (6)

$$(CH_3)_2C=CH-CH_2-CH_2-C(CH_3)=CH-CH=CH-C(CH_3)=CH-CH=CH-C(CH_3)=CH-CH=CH-CH=C(CH_3)-CH=CH-CH=C(CH_3)-CH=CH-CHO$$

Lycopinal.

Oben: braunrot (472, 443, 423 $\mu\mu$, in Benzin),
rotviolett (502, 470, 446 $\mu\mu$): β-Carotinon,
gelbrot (478, 448, 420 $\mu\mu$): β-Oxycarotin,
rotviolett (502, 470, 446 $\mu\mu$): Semi-β-carotinon,
gelb (453,425 $\mu\mu$),
unten: Filtrat: unverändertes Carotin.

Man eluiert die Hauptzonen einzeln mit methanolhaltigem Benzol, wäscht aus, dampft ab und krystallisiert das β-Carotinon (Ausbeute 110 mg) aus Benzol und Benzin, das β-Oxycarotin (285 mg) aus Benzol + Methanol, schließlich das Semi-β-carotinon (nach nochmaliger Chromatographie 240 mg) aus Methanol um. Vom Filtrat ließen sich 500 mg β-Carotin zurückgewinnen.

Chromatographische Reinigung bzw. Isolierung folgender *Abbauprodukte des β-Carotins* s. bei KUHN und BROCKMANN (14): Anhydro-semi-β-carotinon, Bis-anhydro-β-carotinon, β-Carotinon-aldehyd (und sein Oxim), Anhydro-azafrinon-amid, Anhydro-azafrinon-methylester-oxim, Azafrinon-amid, 3,8-Dimethyldecapentaen-1-al-carbonsäure-methylester (auch Oxim und Nitril), 1,6-Dimethyl-octatetraen-1-al-carbonsäure-methylester (und sein Nitril).

Lycopinal aus Lycopin (KUHN und GRUNDMANN 2).

Eine Lösung von 100 mg Farbstoff in 70 cm³ reinstem Benzol wurde mit 100 cm³ Eisessig (über $KMnO_4$ dest.) und dann, Tropfen für Tropfen, unter energischem Rühren mit 11,2 cm³ 0,1n-Chromsäure versetzt. Man entmischt mit 200 cm³ Benzin (Siedep. 70 bis 80°) und 0,5 l doppelt dest. Wasser, wäscht die Benzinschicht säurefrei und schüttelt sie zehnmal mit je 20 cm³ 90proz. Methanol. Nach dem wiederholten

Waschen wird chromatographiert (1 Teil Fasertonerde + 4 Teile Al_2O_3). Das *Lycopinal* $C_{32}H_{42}O$ bleibt vollständig hängen. Man wäscht mit Benzin nach, eluiert mit Chloroform, das 10% abs. Alkohol enthält, engt rasch auf etwa 1 cm^3 ein, fügt 10 cm^3 96proz. Alkohol zu, kocht auf und stellt die Flüssigkeit in den Eisschrank. Ausbeute 25—30% der Theorie. Nach dem Umkrystallisieren aus wenig Benzol + abs. Alkohol, Schmelzp. 147° (korr., evakuiert).

Es wurden Methyl-heptenon $(CH_3)_2C=CH(CH_2)_2 \cdot CO \cdot CH_3$ (als p-Nitrophenylhydrazon) sowie Hentriakontan $C_{31}H_{64}$ aus dem Filtrat gewonnen; das letztere war ein natürlicher Begleiter des Roh-lycopins.

Lycopinal-oxim $C_{32}H_{43}ON$. 30 mg Lycopinal in 10 cm^3 Benzol, dazu 2 cm^3 einer alkoholischen Lösung von zirka 60 mg freiem Hydroxylamin. Nach viertelstündigem Erwärmen auf dem Wasserbad verdünnt man mit Benzin (Siedep. 70—80°) auf 1 l, wäscht das überschüssige NH_2OH mit Wasser weg und teilt die Lösung in der Calciumcarbonat-Säule auf (reinst, gefällt, Merck), wobei das Oxim festgehalten wird. Entwickeln mit Benzin, Eluieren mit Chloroform + Alkohol 9 : 1. Nach dem Einengen krystallisiert man das Präparat aus 96proz. Alkohol um. Ertrag 10 mg, Schmelzp. 198° (korr., evakuiert).

Überführung von Rhodoxanthin $C_{40}H_{50}O_2$ in Zeaxanthin $C_{40}H_{56}O_2$ (KARRER und SOLMSSEN 4) (Strukturformeln teils auf S. 26—27).

Man bereitet zunächst, nach KUHN und BROCKMANN (9) das *Dihydro-rhodoxanthin* $C_{40}H_{52}O_2$: 46 mg Farbstoff werden in 10 cm^3 reinstem Pyridin gelöst, mit 3 cm^3 Eisessig versetzt. Man gibt in die 50° warme Lösung 0,5 g Zinkstaub, worauf sofort durch ein weites Filter abgesogen wird. Der Zusatz von 15 cm^3 Benzin scheidet goldgelbe, glän-

Dihydro-rhodoxanthin.

Tabelle 15. Beispiele für die Chromatographie von Umwandlungs- und Abbauprodukten der Carotinoide.

Ausgangsmaterial (Ansatz)	Isoliert (nachgewiesen)	Adsorbens	Lösungsmittel	Literatur
β-Carotin, Isomerisierung	Pseudo-α-carotin	Al_2O_3	Petroläther	GILLAM und EL RIDI (1, 3)
β-Carotin + Jod + Thiosulfat	β-Carotin, Isocarotin	Fasertonerde + Al_2O_3	Benzin	KUHN und LEDERER (4)
β-Carotin + Benzopersäure	Carotinoxyd	Fasertonerde	Petroläther	EULER, KARRER und WALKER
β-Carotin + Chromsäure	Semi-β-carotinon, β-Carotinon, β-Carotin	Al_2O_3	Benzol + Benzin	KUHN und BROCKMANN (10)
β-Carotin + Chromsäure	β-Oxy-carotin, β-Carotinon	Al_2O_3, $CaCO_3$	Benzin, Petroläther	KUHN und BROCKMANN (6)
β-Carotin + Chromsäure	β-Carotinon, β-Oxy-carotin, Semi-β-carotinon, β-Oxy-semi-carotinon, β-Carotinon-aldehyd	Al_2O_3	Benzol + Benzin	KUHN und BROCKMANN (14)
β-Carotin + Chromsäure	Neo-β-oxycarotin, Semi-β-carotinon	Al_2O_3	Benzol	KARRER und SOLMSSEN (1)
α-Carotin + Chromsäure	α-Oxycarotin, α-Caroton			KARRER, SALOMON und SCHÖPP

α-Carotin + Chromsäure	α-Oxycarotin, α-Caroton, Semi-α-carotinon	Al_2O_3	Benzol + Ligroin	KARRER, EULER und SOLMSSEN
β-Oxycarotin + Chromsäure	Azafrinon-aldehyd	$CaCO_3$	Benzol + Benzin	KUHN und BROCKMANN (13)
β-Carotinon + Chromsäure	β-Carotinon-aldehyd	$CaCO_3$ + Talk Al_2O_3	Benzol + Benzin	KUHN und BROCKMANN (14)
β-Carotinon-aldehyd	Oxime	$CaCO_3$	Benzol	KUHN und BROCKMANN (14)
β-Carotinon + methylalkoholisches Kali	Bisanhydro-β-carotinon	Al_2O_3	Benzol + Benzin	KUHN und BROCKMANN (14)
Anhydro-β-carotinon	Oxim	Al_2O_3	Benzol	KUHN und BROCKMANN (14)
Lycopin + Chromsäure	Bixin-dialdehyd	$CaCO_3$	Benzin	KUHN und GRUNDMANN (1)
Lycopin + Chromsäure	Lycopinal	Fasertonerde + Al_2O_3	Benzin	KUHN und GRUNDMANN (2)
Lycopinal	Oxim	$CaCO_3$	Benzin	KUHN und GRUNDMANN (2)
Physalien + Chromsäure	Physalienon			KARRER, SALOMON und SCHÖPP

Ausgangsmaterial (Ansatz)	Isoliert (nachgewiesen)	Adsorbens	Lösungsmittel	Literatur
Dihydro-rhodoxanthin + Al-isopropylat	Zeaxanthin	$Ca(OH)_2$	Benzol	KARRER und SOLMSSEN (4)
Capsanthin-ester	(Reinigung)	$CaCO_3$	Benzin	ZECHMEISTER und CHOLNOKY (2)
Capsanthin + Al-isopropylat	Capsanthol	$Ca(OH)_2$	Benzol	KARRER und HÜBNER
Capsanthin-diacetat + Chromsäure	4-Oxy-β-carotinon-aldehyd-oxim	$CaCO_3$	Benzol	ZECHMEISTER und CHOLNOKY (4)
Capsanthin-diacetat + Chromsäure	Capsylaldehyd-oxim	$CaCO_3$	Benzol + Benzin	Dieselben (4)
Capsanthin-diacetat + Chromsäure	Capsanthinon, 4-Oxy-β-carotinon-aldehyd, Capsylaldehyd, Capsanthylal	$CaCO_3$	Benzol + Benzin	Dieselben (4)
Capsanthylal	Oxim	$CaCO_3$	Benzol	Dieselben (4)
Capsanthinon + methylalkoholisches Kali	Anhydro-capsanthinon (unbekannte Farbstoffe)	$CaCO_3$	Benzol + Benzin	Dieselben (4)
Capsorubin-diacetat	(Reinigung)	$CaCO_3$	Benzin	Dieselben (3)
Crocetin-dimethylester	(Reinigung)	Al_2O_3	Benzin	KUHN und WINTERSTEIN (3)

Crocetin-dimethylester, thermisch zersetzt	Octatetraen-dicarbonsäure-dimethylester, Tricyclo-crocetinester, 2.6-Dimethyl-naphtalin usw.	Al_2O_3	Benzin	KUHN und WINTERSTEIN (3)
Azafrin-methylester + Chromsäure	Azafrinon-methylester	Al_2O_3	Benzin	KUHN und DEUTSCH
Azafrin-methylester + Chromsäure	Azafrinon-methylester, Azafrinal-I-methylester, Azafrinal-II-methylester	Al_2O_3	Benzol	KUHN und BROCKMANN (14)
Azafrinon	Amid	$CaCO_3$	Benzol	KUHN und BROCKMANN (14)
Anhydro-azafrinonamid	(Reinigung)	$CaCO_3$	Benzol	KUHN und BROCKMANN (14)
Anhydro-azafrinon-methylester	Oxim	Al_2O_3	Benzol	KUHN und BROCKMANN (14)
Azafrinal-I-methylester	Oxim	Al_2O_3	Benzol	KUHN und BROCKMANN (14)
Azafrinal-I-methyl-ester-oxim	Nitril	Al_2O_3	Benzol	KUHN und BROCKMANN (14)
Azafrinal-II-methyl-ester-oxim	Nitril	Al_2O_3	Benzol	KUHN und BROCKMANN (14)

zende Blättchen ab (Ausbeute 65%), welche, aus Benzol + Methanol umkrystallisiert, bei 219° schmelzen.

65 mg Dihydro-rhodoxanthin wurden in 15 cm^3 Benzol gelöst und mit 20 cm^3 abs. Isopropylalkohol, dann mit 2 g Aluminiumisopropylat versetzt, hierauf 24 Stunden gekocht (100-cm^3-Rundkolben; hohe Fraktioniersäule mit Drahtspirale; Temperatur am oberen Ende, von wo ein absteigender Kühler ausgeht, höchstens 40°; trockener N_2-Strom). Das überschüssige Isopropylat zersetzt man durch Erwärmen mit 20 cm^3 10proz. KOH, treibt den Farbstoff in Äther, wäscht, trocknet, dampft ab. Der Rückstand lieferte in Benzol, auf $Ca(OH)_2$ das Chromatogramm:

Oben: gelborange (510, 480 $\mu\mu$, in CS_2),
gelb,
gelb (uneinheitlich),
unten: gelborange (515, 485 $\mu\mu$).

Die unterste Scheibe, welche die Hauptmenge des Pigments enthielt, wurde mit Benzol + Methanol eluiert. Man wäscht mit Wasser, dampft im Vakuum ein und krystallisiert den Trockenrückstand aus Methylalkohol um. Ausbeute 8 mg Zeaxanthin, Schmelzp. 204—205° (unkorr.); 518, 483 $\mu\mu$, in CS_2.

5. Naphtochinon- und Anthrachinonfarbstoffe.

a) Der in die *Chinizarinreihe* gehörende Pilzfarbstoff *Boletol* (aus *Boletus satanas* oder *B. badius*) wurde von Kögl und Deijs synthetisch erhalten und von dem begleitenden Isoboletol chromatographisch getrennt. Welches der beiden nachstehenden Symbole dem natürlichen Boletol und welches dem Isomeren zukommt, ist noch ungewiß; jedenfalls bedingt der mäßige Unterschied in dem Molekülbau eine namhafte Verschiebung der Adsorptionsaffinität.

OH O COOH / HO— / OH O — OH O / HO— / OH O COOH

Boletol und Isoboletol.

Nachdem die Chinizarin-α-carbonsäure mit Hilfe von Bleitetraacetat zum entsprechenden Dichinon dehydriert wurde, hat

man 100 mg Rohprodukt mit 8 cm^3 Acetanhydrid und einigen Tropfen konz. Schwefelsäure 10 Minuten gekocht (Eintritt von 2 Acetyl- sowie 1 Acetoxy-Gruppe in den Kern) und das Filtrat vom Bleisulfat vorsichtig mit Wasser versetzt. Die entstandene gelbbraune Fällung wurde mit 5proz. alkoholischem Kali $^1/_2$ Stunde am Wasserbad erwärmt, nach dem Ansäuern ausgeäthert und die alkoholische Lösung des Abdampfrückstandes auf käuflichem Al_2O_3 (35 × 2 cm) chromatographiert; Entwickeln nacheinander mit Alkohol, Benzol und Xylol.

Oben: breit, rotbraun: enthält Hauptmenge der Boletole,
gelbbraun: enthält wenig Boletole,
gelbgrün
dunkel blaßgrün } Begleiter.
unten: grau

Die Elution erfolgt hier jeweils mit 1proz. KOH, worauf man die Lösung ansäuert und ausäthert. Die beiden oberen Fraktionen wurden vereinigt, erneut chromatographiert, dann mit Alkohol, Aceton und schließlich mit 50proz. Aceton nachentwickelt. Es entstanden zwei leicht trennbare Ringe, deren Pigmentinhalt wie soeben beschrieben sich isolieren ließ.

b) Auch in der Reihe des *Chrysarobins* läßt sich die Chromatographie verwenden. Nach LEDERER (Privatmitteilung) erhält man reine Farbstoffe auf Calciumcarbonat oder Magnesiumoxyd aus Benzollösung verhältnismäßig leicht, die Präparate erwiesen sich jedoch als Gemische, z. B. von Chrysophanol (Chrysophansäure) $C_{15}H_{10}O_4$ mit einem seiner Monomethyläther, welche an den genannten Adsorbentien zunächst sich nicht trennen lassen.

Die Farbstoffe der Wandflechte *Xanthoria parietina* sind der Methode gleichfalls zugänglich (Hauptfarbstoff *Parietin*).

c) *Alkannin*. Dieses aus *Alkanna tinctoria* gewonnene Naphtochinonderivat $C_{16}H_{16}O_5$ wird von dem Nebenfarbstoff *Alkannan* $C_{16}H_{18}O_4$ (3-Isohexyl-naphtazarin) begleitet, das von BROCKMANN (2) bei der in Benzin auf Kieselgur ausgeführten Chromatographie vorgefunden wurde. Entwickelt man mit Benzin, so bildet sich eine hellrote Zone unterhalb der roten Hauptschicht aus. Man eluiert mit methanolhaltigem Benzin, wieder-

OH O OH
—CH_3
O

Chrysophanol (1,8-Dioxy-3-methyl-anthrachinon).

holt den Adsorptionsversuch, dampft das Eluat ein und krystallisiert die Rückstände aus 80proz. Methylalkohol um.

Mengenverhältnis Alkannan : Alkannin = 1 : 1900.

Alkannin (möglicherweise steht CHOH bei a und CH_2 bei b).

Nach der katalytischen *Hydrierung* von Alkannin-methyläther mit 2 H_2 ließ sich das in Benzin gelöste Reaktionsprodukt im Wege einer Filtration durch die $CaCO_3$-Säule reinigen, wobei Begleiter als rotviolette Zone hängen bleiben. Die Hauptmenge des Farbstoffes wurde dem Filtrat mit n-Natron entzogen. Man schüttelt diese Lösung mehrmals mit Benzol durch, treibt nach dem Ansäuern (Essigsäure) den Farbstoff durch Wasserzusatz in Benzol, wäscht, verdampft im Vakuum zur Trockne und filtriert die Benzinlösung des Rückstandes durch eine Säule von $CaCO_3$. Der Abdampfrückstand des Filtrats liefert beim Umlösen aus verdünntem Methanol rote Tröpfchen, im Eisschrank Nädelchen, Schmelzp. 50—51°.

Über *Dichlor-chinizarinchinon* s. bei CRIEGEE.

6. Flavine (Lyochrome).

Lactoflavin (Vitamin B_2).

Bei der Isolierung von Flavin aus pflanzlichen und tierischen Organen dienten zur Anreicherung des Pigments öfters Adsorptionsmethoden, jedoch nicht in der von TSWETT vorgeschlagenen Form. Als Beispiele seien u. a. die Arbeiten von ELLINGER und KOSCHARA, von KUHN, GYÖRGY und WAGNER-JAUREGG (1—3), von KUHN, WAGNER-JAUREGG und KALTSCHMITT (Adsorbens Fullererde), von KARRER, SALOMON und SCHÖPP (Bleisulfid, Frankonit), von KARRER und SCHÖPP (3) angeführt. Die letztgenannten Autoren sowie EULER, KARRER, ADLER und MALMBERG reinigen ihre Präparate schließlich chromatographisch, nach der Überführung in die Acetate, welche dann auf einer Aluminiumoxyd-

Säule aus Benzol festgehalten werden. Elution mit Methanol + Benzol. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Flavine entweder in wäßriger Lösung, in nativem Zustand chromatographiert werden können, oder aber nimmt man eine Acylierung vor und arbeitet dann in wasserfreiem Medium. Beide Ausführungsformen werden nachfolgend mit Beispielen belegt.

Isolierung von Tetraacetyl-lactoflavin aus Heu.

KUHN und KALTSCHMITT haben die umständliche Gewinnung des Flavins aus 103 kg Heumehl (kalifornische Luzerne) folgend ausgeführt.

Das mit Hilfe anderer Methoden recht weitgehend vorgereinigte und *acetylierte* Rohprodukt wurde in trockenes Chloroform getrieben, das 100 mg Farbstoff enthielt. Den braunen Abdampfrest des Chloroforms löste man in alkoholfreiem Essigester, goß die Flüssigkeit auf eine Al_2O_3-Säule (standardisiert nach BROCKMANN) und entwickelte das Chromatogramm mit dem erwähnten Solvent. Die lebhaft gelbe Hauptzone ließ sich mit Essigester + Methanol (4 : 1) eluieren. Man wiederholt mit dem Abdampfrückstand des Eluates den Adsorptionsversuch und beobachtet als Ergebnis, daß das Pigment in zwei Komponenten zerfällt.

Die obere Scheibe wurde mit Wasser eluiert und das Eluat mehrmals mit Essigester durchgeschüttelt, wobei das Wasser viel Farbstoff, nämlich verseiftes Flavinacetat zurückhält. Man vereinigt die Essigesterauszüge mit dem aus der unteren Scheibe erhaltenen Acetyl-flavin: Dieser untere Farbring wurde mit Essigester + Methanol (4 : 1) eluiert, die Lösung im Vakuum verdampft und der hellgelbe Rückstand (30 mg) zweimal aus abs. Alkohol, sodann zweimal aus Wasser umkrystallisiert. Der entsprechende Bezirk des zweiten Chromatogramms lieferte weitere 17 mg Acetat. Gelbe Prismen, Schmelzp. 235° (Zersetzung).

Nach einem ähnlichen Verfahren ließ sich acetyliertes Lactoflavin auch aus der Süßwasser-*Alge Cladophora sauteri* isolieren: HEILBRON, PARRY und PHIPERS.

Noch nicht näher gekennzeichnete, im Quarzlicht lebhaft fluoreszierende Bestandteile von *Blättern* wurden von STRAIN (2) chromatographisch nachgewiesen (Lösungsmittel: Petroläther, Adsorbens: Magnesiumoxyd + Siliciumerde).

Eine blau fluoreszierende Substanz, deren Zusammenhang mit dem Lactoflavin ebenfalls noch unklar ist, haben EULER und BRANDT (1, 2) aus dem *Corpus luteum* erhalten. Man extrahiert das Material mit Aceton, hierauf mit 70proz. Aceton, dampft die Lösung auf $^1/_3$ ein und reinigt sie durch Ausschütteln mit Äther, dann mit Chloroform. Die Chromatographie wurde aus Wasser auf Frankonit vorgenommen und lieferte 4 Schichten. Beim Entwickeln mit schwachem Alkali ($p_H = 9$) wandert die blau fluoreszierende Substanz in das gelbe Filtrat.

Synthetische Flavine.

KUHN und WEYGAND (1) haben die bei der Synthese des *6,7-Dimethyl-9-n-amyl-flavins* auftretenden Nebenprodukte folgend ausgeschaltet: Trockenes 1,2-Dimethyl-4-amino-5-[n-amyl-amino]-benzol wurde in Eisessig gelöst, mit überschüssigem Alloxan versetzt und einige Minuten gekocht. Nach Verdünnen mit Wasser extrahiert man das Flavin vollkommen mit Chloroform, trocknet dann und verdampft den Auszug. Das Rohprodukt wird mit Aluminiumoxyd verrieben und das Gemisch in den Oberteil einer Al_2O_3-Säule eingestampft. Beim Aufgießen von Xylol + Methanol lassen sich die Begleiter rasch auswaschen, während das Flavin nur langsam abwärts wandert.

Reinigung von synthetisch bereitetem *6,7-Dimethyl-flavin-9-essigsäure-methylester*: KUHN und RUDY (Chloroform, Aluminiumoxyd-Säule, Elution mit Chloroform + Methanol 10 : 1).

Die Flavine (Lyochrome) des Harnes (KOSCHARA 1—3).

a) Darstellung von Uroflavin aus Männerharn. Das „Uroflavin", das in den meisten Eigenschaften mit dem Lactoflavin übereinstimmt, besteht etwa hälftig aus Lactoflavin und einem O-reicheren Lyochrom. Es wurde aus 5000 l Harn folgend isoliert:

Anreicherung. Die Vorschrift für die einleitenden Operationen ist S. 144, unter „Uropterin" abgedruckt, bis zum Absaugen der sog. Purinfraktion (1,2 kg). Das Filtrat wird mit 12 l einer Lösung, enthaltend 600 g Bleiacetat und 420 g Bleihydroxyd, gefällt. Nach dem Absitzen über Nacht wird abgehebert und der Niederschlag genutscht. Man vermengt das Filtrat mit 1,2 l 10proz. Bleizucker und sättigt mit H_2S. Nach dem Absitzen wird gehebert, das PbS abfiltriert und mit wenig Wasser nachgewaschen. Man eluiert es mit insgesamt 50 l eines heißen Gemisches von

Wasser + Pyridin + Eisessig (9 : 1 : 0,2), dampft im Vakuum auf 8 l ein, äthert 24 Stunden aus, filtriert von einer geringen Fällung und bringt die wäßrige Lösung auf 4,2 l. Dieses *Konzentrat* enthält 700 mg Lyochrome (etwa 100 mg sind abgefallen).

Die chromatographische Isolierung geschieht in zwei Stufen, auf Floridin-Bleicherde XXF. Im ersten Chromatogramm (Flavin oben festgehalten) wird zunächst das Aquoflavin (s. unter b) mit dem Waschwasser abgetrennt und dann das Lyochromgemisch mit Methanol + Pyridin + Wasser (3 : 1 : 1) eluiert (stark gefärbte Verunreinigungen bleiben in der Erde zurück). Bei einem zweiten Chromatogramm entfernt intensives Waschen weitere Begleitfarbstoffe, worauf die Lyochrome mit Methanol + Pyridin + Wasser abermals entwickelt werden. Nachdem die Hauptmenge des Farbstoffes eluiert worden, krystallisiert aus dieser Fraktion (nach dem Einengen) das Uroflavin aus und wird zweimal aus n-Essigsäure umgeschieden. Feine Nädelchen, Ausbeute 220 mg.

In der Säule verbleiben zwei Farbscheiben (sog. 3. und 4. *Harnlyochrom*), die mit 5proz. Pyridin gemeinsam entwickelt und in einem weiteren Chromatogramm geschieden werden können.

Reinigungsversuche. In Wasser konnte chromatographisch ein blau fluoreszierender Farbstoff abgetrennt werden, doch sind die Ergebnisse noch nicht endgültig. Man verwendet hier am besten die gröber disperse Bleicherde XS, da an XXF (anders als bei Rohlösungen) ein Farbstoffanteil allzu fest haftet und Fraktionierung vortäuschen könnte.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Säule die Anwesenheit von vier Farbstoffen verraten hat:

Oben: „drittes“ Harnlyochrom }
„viertes“ Harnlyochrom }
Uroflavin (Gemisch; 95% der Gesamtlyochrome),
unten: Aquoflavin, schon mit Wasser auswaschbar.

b) Aquoflavin und Lumi-aquoflavin (KOSCHARA 2). Das *Aquoflavin* wird, wie erwähnt, mit Wasser von der Bleicherde abgelöst. Man engt ein, versetzt mit $^1/_5$ Vol. 2n-Schwefelsäure und adsorbiert nochmals. Waschen mit Wasser entfernt zuerst Begleiter und entwickelt dann langsam die gelbrot fluoreszierende Aquoflavinzone. Braune Farbstoffe bleiben im Adsorbens zurück.

10 cm^3 Aquoflavinlösung (1,3 mg Farbstoff) wurden mit 2 cm^3 2n-NaOH versetzt und in einer Petrischale auf weißem Grund mit der 75-Watt-Metallfadenlampe bestrahlt (Abstand 10 cm, Dauer

55 Minuten). Man gibt 4 cm³ der Schwefelsäure zu, schüttelt mit Chloroform aus, befreit die wäßrige Lösung im Vakuum von $CHCl_3$-Resten und chromatographiert sie auf Bleicherde XXF (2,8 × × 2 cm). Das *Lumi-aquoflavin* wird ganz oben fixiert und läßt sich, im Gegensatz zum Aquoflavin, mit Wasser nicht entwickeln. Elution mit 5proz. wäßrigem Pyridin.

c) Quantitative Bestimmung der Flavine (Lyochrome) im Harn (KOSCHARA 3).

250 cm³ Harn werden unter Zusatz von Octylalkohol im Vakuum auf 50 cm³ eingeengt, mit 0,5 cm³ konz. HCl versetzt und (ohne Rücksicht auf eine Fällung) chromatographiert (4 × 2 cm Bleicherde XS, mit Säure vorbehandelt). Man wäscht die Säule mit 20 cm³ 0,1n-HCl, eluiert mit Wasser + Pyridin + Eisessig (9 : 1 : 0,2), bis das Filtrat farblos abtropft, welches im Vakuum, zum Schluß unter Zusatz von Bariumcarbonat, eingeengt wird. Nun wird filtriert und die Lösung (20 cm³) mit 5 Tropfen Eisessig angesäuert. Man kühlt in Eis, setzt 6 Tropfen kaltgesättigtes Permanganat zu und zerstört den Permanganatüberschuß 1 Minute später mit 1 Tropfen 3proz. H_2O_2.

Nach dieser Bleiche gibt sich das Lyochrom durch grüne Fluorescenz im Quarzlicht zu erkennen. (Fluoresziert die Lösung rein blau, so ist eine weitere Reinigung zwecklos, da dann der Flavingehalt unter 10 γ-% liegt.) Nun folgt wieder eine Adsorption an Bleicherde XS (2 cm hoch). Man wäscht mit Wasser, trennt mit 2proz. wäßrigem Pyridin einen blau fluoreszierenden Anteil ab, eluiert die Flavine mit Methanol + Pyridin + Wasser (3 : 1 : 1) und kontrolliert die Vollständigkeit der Elution mit Pyridin + Essigsäure-Gemischen. Schließlich engt man das Eluat auf 5 cm³ ein und mißt es im Stufenphotometer.

Das Verfahren ist auch auf andere Flüssigkeiten anwendbar. — Bestimmung in Harn-Konzentraten (4,2 l aus 5000 l) s. im Original.

7. Pterine.

Die Pterine bilden eine besondere, u. a. in den Insekten weit verbreitete Farbstoffgruppe, deren Vertreter, im Hinblick auf den hohen Stickstoffgehalt, eine pyrimidin- oder purinartige Struktur besitzen werden (Definition und Nomenklatur: SCHÖPF und BECKER). Die nachstehenden Angaben über die Chromato-

graphie von Insekten-, namentlich von Schmetterlingpterinen stammen aus der neuen, umfangreichen Arbeit von SCHÖPF und BECKER sowie von BECKER und SCHÖPF. Die chromatographische Isolierung von Urpterin aus Menschenharn wird nach KOSCHARA (5) auf S. 143 beschrieben.

Das Adsorptionsverhalten der wichtigsten Pterintypen (wahrscheinlich Gemische) gibt das folgende Bild:

Erythropterin wird aus sehr verdünntem, wäßrigem oder methanolischem HCl (n/250) viel besser adsorbiert als *Xanthopterin* $C_{19}H_{18}O_6N_{16}$ und bleibt als schmale Zone hängen, während das Xanthopterin aus wäßrigem HCl nur sehr schwach, aus methanolischem etwas stärker festgehalten wird. Man kann (vorteilhaft im Mikroadsorptionsrohr, S. 57) Xanthopterinpräparate in wäßriger Salzsäure auf Erythropterin, sowie Erythropterin in methanolischem HCl auf Xanthopterin prüfen (Al_2O_3). Im ersteren Fall bleibt das Erythropterin oben hängen (rote Farbe, im Quarzlicht dunkelsamtbraun leuchtend), im zweiten Fall erblickt man unterhalb des roten Erythropterins das Xanthopterin als schmale, gelbe Zone (Fluorescenz gelbgrün). Adsorbiert man aus schwach saurer Lösung, so werden im Al_2O_3 beide Farbstoffe allmählich zerstört: der Xanthopterinring wird beim Entwickeln mit wäßrigem oder methanolischem HCl immer schwächer und verschwindet schließlich; das Durchwandernde zeigt blaue Fluorescenz.

Betreffend Erythropterin und Xanthopterin seien noch die folgenden Einzelheiten der erwähnten Arbeit von SCHÖPF und BECKER entnommen.

An Al_2O_3 und Floridin XXF wurde *Erythropterin* aus stark verdünnten Lösungen in n/250—n/500-HCl, an Frankonit aus Essigsäure + Natriumacetat adsorbiert; man eluiert aus Aluminiumoxyd mit 0,5n-NH_3, sonst mit 4proz. Pyridinwasser. Auf Frankonit KL zeigt Erythropterin in Essigsäure + Natriumacetat scheinbare Heterogenität, welches vielleicht von der Uneinheitlichkeit des Adsorptionsmittels hervorgerufen wird.

Xanthopterin. Aus wäßriger Lösung wird es bei neutraler oder schwach saurer Reaktion von Al_2O_3, Frankonit KL oder Floridin XXF gebunden; bei etwas stärkerer Acidität wandert es rasch durch das Aluminiumoxyd. Von gereinigtem Floridin (S. 43) wird das Xanthopterin wie Erythropterin aus n/250—n/500-HCl aufgenommen. Frankonit KL bindet es aus essigsauren oder neutralen Medien zu einem sehr konzentrierten Adsorbat an der oberen Fläche der Säule. Nach dem Waschen mit Wasser eluiert es 0,5 n-NH_3 glatt. — Adsorption aus absolut-methanolischer Lösung: Auf Aluminiumoxyd

wird Xanthopterin aus seiner Lösung in 0,01proz. methanolischem Chlorwasserstoff gut festgehalten, es blaßt jedoch in einer hohen Säule beim lange fortgesetzten Entwickeln allmählich aus. An Bariumsulfat wird Xanthopterin aus methanolischem Pyridin, in Gegensatz zu Erythropterin, nicht fixiert.

Das *Chrysopterin* wird von Aluminiumoxyd aus n/250-Salzsäure (in der es, wie in 0,5 n-Essigsäure, violettblau fluoresziert) stärker festgehalten als Xanthopterin, und zwar mit gelbgrüner Fluorescenz. Bei der Adsorption aus methanolischem HCl besteht kein so charakteristischer Unterschied. Das farblose und nicht fluoreszierende *Guanopterin* läßt sich, wie Xanthopterin, aus schwach saurer, verdünnt-wäßriger Lösung auf Frankonit KL festhalten und wird von 0,5 n-Ammoniak eluiert.

(Weitere zahlreiche Einzelheiten betreffend Adsorptionsverhalten s. im Original.)

Darstellung von Roh-xanthopterin aus *Appias nero* (eine Pieride aus Java). Die Flügel von 2000 Tieren (32,2 g) wurden mit Äther entfettet, mit Alkohol vorbehandelt, mit Ammoniak ausgezogen und die Lösungen mit Salzsäure fraktioniert (Näheres im Original). Ein Teil des Farbstoffes gelangte in salzsaure Mutterlaugen (5 l) und ließ sich adsorptionsanalytisch weiter verarbeiten:

Die Lösung wurde mit gesättigtem Natriumacetat vorsichtig so weit abgestumpft, daß die Reaktion gegen Kongopapier etwa einer n/300-Salzsäure entsprach, dann ohne Filtration durch eine 20-mm-Schicht von Al_2O_3 (puriss. Merck) gesaugt (Jenaer Glas-Büchner-Trichter mit Schlitzsieb „S 70"). Man spült mit wenig Wasser nach. Oben sitzt ein dunkelrotvioletter Belag (1 mm), darunter eine stark rotbraune Zone (Erythropterin); der Rest des Adsorptionsmittels war schwach rosa gefärbt.

Die durchlaufende, honiggelbe Xanthopterinlösung trübte sich nach 24 Stunden bräunlich und wurde durch 10 mm Al_2O_3 gesaugt. Man verwarf das braune Adsorbat und schickte das mit 25 cm^3 gesättigtem Natriumacetat völlig abgestumpfte Filtrat ein drittes Mal durch das Oxyd (10 mm). Das kräftig gelbe Filtrat fluoreszierte jetzt im Uviollicht gelbgrün und schied bald eine zitronengelbe Trübung ab. Es wurde nun auf eine 10-mm-*Frankonit-KL*-Säule gegossen, wo der Farbstoff sich festhielt (5 mm hoch; Filtrat verworfen).

Man räumt die tiefgelbe Schicht ab, wäscht sie in der Zentri-

fuge einmal mit Wasser, eluiert dreimal mit je 100 und fünfmal mit je 50 cm³ 0,5 n-NH_3. Die sehr trübe, schmutziggelbe Lösung saugt man durch 5 mm festgestampfte Asbestwolle (Glas-Büchner-Trichter „S 55"), welche grauviolette Stoffe zurückhält, und fällt die klare, goldgelbe Lösung mit Eisessig. Der Niederschlag wurde zentrifugiert, zweimal mit Wasser gewaschen und je sechsmal mit 100 cm³ bzw. mit 50 cm³ 0,25 n-HCl ausgezogen. Beim Abstumpfen mit gesättigtem Natriumacetat erhält man aus den einzelnen Extrakten hell goldgelbe Fällungen des rohen Xanthopterins, welche gemeinsam zentrifugiert und mit Wasser bis zu Beginn der kolloidalen Auflösung gewaschen werden (1,3 g).

Mikro-chromatographie von Pterinen.

Diese Methodik wurde von Becker und Schöpf ausgearbeitet, unter Verwendung des S. 57 wiedergegebenen Mikro-adsorptionsrohres (Abb. 21). Einschlägige Erfahrungen werden auch auf anderen Gebieten verwertbar sein. Die Substanzmengen, mit welchen man hier arbeitet, liegen in einer Größenordnung, hinunter bis zu wenigen γ. Die nachstehenden Vorschriften beziehen sich zunächst auf reine Pterinlösungen und behandeln dann Insektenrohextrakte (weitere Beispiele im Original).

Xanthopterin. Aus einer Lösung von Xanthopterin in 0,01proz. *methanolischer* Salzsäure wird der Farbstoff auf Aluminiumoxyd als scharfe, gelbe Zone festgehalten. Die Probe gelingt auch dann, wenn das Xanthopterin nur als geringfügige Komponente eines Stoffgemisches vorliegt. Im ultravioletten Licht beobachtet man eine lebhaft gelbgrüne Fluorescenz. Es ist wichtig, den Farbstoff nicht weiter zu entwickeln, als bis er das 3—4fache der Zonenhöhe durchwandert, da sonst Zersetzung eintritt. Wird dies durch Einschränkung des Lösungsmittels vermieden, so läßt sich auf Grund der Höhe auch die Menge des Xanthopterins abschätzen. Erfassungsgrenze 1 γ. Der letztere Farbstoff ist neben Erythropterin sehr gut nachweisbar, das von Al_2O_3 kräftiger adsorbiert wird. Aus der ersten und dritten Spalte von Tabelle 16 (S 142) ist ersichtlich, daß annähernde Proportionalität zwischen der Xanthopterinmenge und der Scheibenhöhe besteht. Eine Entwicklung wurde hier nicht durchgeführt; Gesamtvolumen der Lösung: je 5 cm³.

Tabelle 16. Annähernde Bestimmung des Xanthopterins im Gemisch mit Erythropterin (Mikro-adsorptionsrohr, Aluminiumoxyd).

5 cm^3 0,01proz. methanolische Salzsäure enthielten		Höhe der Xanthopterinzone (mm)	Aussehen des Chromatogramms
Xanthopterin (γ)	Erythropterin (γ)		
0	40	—	Breite, orangerote Zone.
5	0	2	Xanthopterinband (gelb) im Quarzlicht gelbgrün.
10	0	4	
0,4	40	0,2	Oben rot, darunter gelb (nur im Uviollicht erkennbar).
2	40	fast 1	Dasselbe.
40	2	15	Über dem Xanthopterin orangerotes Erythropterin.
40	4	15	Dasselbe.

Aus *wäßriger* n/250-Salzsäure wird das Xanthopterin von Aluminiumoxyd schwächer adsorbiert als aus methylalkoholischem HCl. Man erhält bei Anwesenheit von 0,5—1 γ in 0,5—1 cm^3 breite Adsorbate, die im Tageslicht unsichtbar sind, aber unter der Quarzlampe hell gelbgrün aufleuchten. Ist die Pigmentmenge etwas größer, so fluoresziert fast die ganze Säule. Steht noch mehr Rohfarbstoff zur Verfügung, so kann man ähnlich verfahren wie KOSCHARA (4, 5) bei der Isolierung des Uropterins (Adsorption aus Pufferlösung an Frankonit, waschen, mit Puffer eluieren usw., vgl. S. 143).

Im Aluminiumoxyd wäre eine Verwechslung mit Lactoflavin möglich, doch unterscheidet hier die Fluorescenz des Adsorbates. Lactoflavin: warmer, fast orangegelber Farbton, Xanthopterin: kaltgelblichgrüne Nuance.

Erythropterin. Zum mikrochemischen Nachweis dieses roten Farbstoffes sind n/250-Salzsäure und Al_2O_3 geeignet, da nur aus wäßriger Lösung eine scharfe Zone sich ausbildet, welche mit der erwähnten Säure als Ganzes abgetrennt werden kann. Farbe des Adsorbats schön orangerot, Ultraviolettfluorescenz samtbraun. Erfassungsgrenze: 5 γ Erythropterin in 5 cm^3 Lösung; man erhält dann eine weniger als 1 mm hohe Schicht im Mikroadsorptionsrohr.

Mikro-chromatographischer Nachweis von Pterinen in Insekten.

Nach BECKER und SCHÖPF wird das Pigment zweimal mit 0,5 n- und eventuell noch einmal mit 2 n-Ammoniak kalt ausgezogen. Man zentrifugiert die vereinigten Extrakte klar, dunstet sie über Ätzkali und Schwefelsäure im Exsiccator ein und untersucht den Rückstand.

Gonepteryx rhamni (Zitronenfalter). 20 Discoidalflecke von den Flügeln von 5 Männchen wurden mit dem Korkbohrer ausgestochen und wie oben behandelt. Man nimmt das Material mit 1 cm^3 n/250-wäßriger Salzsäure auf, saugt es im Mikrorohr auf Al_2O_3 und wäscht mit 0,75 cm^3 der Säure nach. Chromatogramm:

3 grau (Verunreinigungen),
1,5 orangerot: *Erythropterin* (im Uviollicht braune Fluorescenz),
4 fast farblos, im Uviollicht blau (Zersetzungsprodukt),
bis an das untere Ende fast weiß, gelbgrün leuchtend: *Xanthopterin*.
Beim Weibchen sah das Bild etwas anders aus.

Vespa crabro. Die Abdominal-integumente (25 mg) wurden zweimal mit je 1 cm^3 0,5 n-NH_3 ausgezogen und der durch Eindunsten gewonnene Rückstand mit 1 cm^3 0,01proz. methanolischem HCl verrieben. Man filtriert die vorsichtig abgehobene Lösung im STRZYZOWSKI-Trichter durch Watte und chromatographiert sie auf Al_2O_3: 5 mm unter der Oberfläche erschien eine 7-mm-Xanthopterinzone (gelb, im Quarzlicht hell gelbgrün fluoreszierend). Wiederholt man die Behandlung des eingangs erwähnten Rückstandes mit n/250-wäßriger Salzsäure, so liefert dieser Auszug das folgende Bild:

. grau (Verunreinigungen),
2,5 blaue Fluorescenz: Zersetzungsprodukte des adsorbierten Xanthopterins,
den Rest der Säule bedeckend: Xanthopterin, leuchtet hellgrün.
Weitere Beispiele im Original.

Isolierung von Uropterin aus Menschenharn.

Dieser gelbe Farbstoff, der dem Xanthopterin des Zitronenfalters (*Gonepteryx rhamni*) nahesteht, positive Murexidprobe gibt und im Harn in einer Verdünnung von 1 : 1000000 vorkommt, ist dort von KOSCHARA (5) entdeckt und isoliert worden. Die Arbeit bietet ein schönes Beispiel für das Zusammenwirken von Fluorescenzbeobachtung und Adsorptionsanalyse.

Anreicherung vor der Chromatographie. Es wurden täglich 200 l Harn in 3 l 25proz. HCl aufgefangen. Zunächst hat man 10 Min. lang mit 4 kg Bleicherde XXF verrührt, abgehebert und das Sediment abgesaugt, das (ohne Waschen) mit 10—15 l 20proz. wäßriger Pyridinlösung eluiert wurde. Nach dem Einengen der Eluate aus 5000 l Harn, im Vakuum, auf 60 l, wurden folgende Operationen vorgenommen: Fällung absaugen (Purinfraktion = 1,2 kg), je 50 g dieser trockenen Fraktion mit 500 cm³ n-NaOH 1 Stunde schütteln, Ungelöstes abzentrifugieren und die Behandlung wiederholen. Alkalische Lösung einlaufen lassen in 1 l doppeltnormale kochende HCl; auf 60—70° halten, bis der tiefgefärbte, amorphe Niederschlag durchkrystallisiert ist (2—3 Minuten). Nach dem Kühlen das braune Krystallmehl (30 g Harnsäure) absaugen, das Filtrat (Xanthinbasen) mit 170 g Bleicherde verrühren; abnutschen, die Bleicherde säurefrei waschen, mit 1,2 l 5proz. Pyridin eluieren und das Eluat auf 0,4 l einengen. Man versetzt mit 60 cm³ konz. NH_3 und 20 g NH_4Cl (Gesamtvolumen 550 cm³), verrührt mit 30 cm³ 5proz. $AgNO_3$-Lösung, zentrifugiert den Niederschlag (Xanthinbasen) ab und fällt die Mutterlauge erneuert mit 240 cm³ Silbernitrat. Die letztere Fällung, die den *Farbstoff* enthält, wird auf der Zentrifuge (ohne Waschen) mit n-HCl verrührt, wodurch der Farbstoff sich löst. Man versetzt die Lösung mit Bleicherde, wäscht die letztere säurefrei, eluiert sie mit Pyridin, entfernt dasselbe im Vakuum und nimmt die pyridinfreie Farbstofflösung in 500 cm³ Phosphatpuffer auf (p_H 7,6).

Adsorptionsanalyse. 90 g Frankonit KL werden mit 250 cm³ Phosphatpuffer (p_H 7,6) verrührt. Man gießt den Schlamm auf eine Nutsche (Durchmesser 12,3 cm), bei ganz schwachem Saugen (zwischen Ansetzen des Schlammes und dem Aufgießen: mindestens 1 Stunde). Es wird sehr vorsichtig gesaugt und nach Ausbildung der Kolonne die Lösung des Farbstoffes in dem Phosphatpuffer (500 cm³) aufgegossen. Man saugt anfangs mit einem Unterdruck von 5 cm Wassersäule, welcher allmählich auf 30 cm gesteigert wird. Später kann höheres Vakuum angeschlossen werden. Nach dem Durchlaufen der Farbstofflösung wird mit 250 cm³ Phosphatpuffer (p_H 7,6) und folgend mit 800 cm³ sek. Natriumphosphat ($^1/_{15}$-molar; p_H 8,3) gewaschen. Dadurch wird nur wenig Begleitstoff entfernt, doch ist das intensive Waschen nötig, da die Säule nur so zur Entwicklung vorbereitet wird.

Man eluiert mit Boratpuffer (p_H 9,2): nach zirka 300 cm³ Puffer erscheint im Filtrat der erste Farbstoff. Die Abgrenzung der Uropterinfraktion (im allgemeinen 200 cm³) von nachfolgenden Farbstoffen ist schwierig. Sie ist gegenüber den letzteren stets ausgezeichnet durch ihre größere Leuchtkraft im Tageslicht und

durch Stärke der Rotfluorescenz unter der Quarzlampe. Beim Stehen über Nacht, in Eis krystallisieren gelbe Warzen (30 mg): ein Salz mit einem Bestandteil der Bleicherde.

Es wird mit Lauge extrahiert, auf n-NH_3 gebracht und — ebenso wie die Mutterlauge — aus ammoniakalischer Lösung mit $AgNO_3$ gefällt. Silbersalz einmal mit n-NH_3, einmal mit Wasser waschen, mit 10 cm^3 n-HCl zerlegen, zentrifugieren und filtrieren; AgCl mit 5 cm^3 HCl nachwaschen. Man kühlt die salzsaure Lösung in Eis, stumpft sie mit gesättigtem Natriumacetat ab und zentrifugiert die amorphe, rotgelbe Fällung nach 1 Stunde. Dreimaliges Waschen mit 5 cm^3 Eiswasser. Von dem amorphen Farbstoff (40 mg) wurden 7,5 mg in 10 cm^3 n-NH_3 gelöst, mit 10 cm^3 n-Essigsäure versetzt, gekocht, filtriert. Im Filtrat erschienen rotgelbe Krystallkugeln und beim Stehen eine grüne Krystallhaut: zusammen 3,8 mg.

8. Anthocyane.

Die Chromatographie von Anthocyanen wurde bereits von TSWETT (9; 1, dort S. 229) versucht, jedoch wieder aufgegeben,

Cyaninchlorid.

Paeoninchlorid.

weil diese Farbstoffe in Benzin, Schwefelkohlenstoff usw. unlöslich sind. Die neuesten Arbeiten von KARRER und STRONG (1) bzw. von KARRER und WEBER haben dann an zwei Beispielen gezeigt, daß man diese Schwierigkeit umgehen kann.

KARRER und STRONG (1) nehmen die Bearbeitung in wäßriger Lösung vor, auf einer Aluminiumoxyd-Kolonne, die mit Leitungswasser nach RUGGLI und JENSEN (1) schwach aktiviert ist. Es sei bemerkt, daß auch ein homogenes Anthocyan in rote, blaue, eventuell blaugrüne Zonen zerfallen kann, da das basisch wir-

Delphinidinchlorid.

kende Adsorptionsmittel einen Teil des Oxoniumsalzes umsetzt, unter Bildung von Carbinolbase und Phenolbetain. Das Aufteilen der Säule führt dann nicht zu verschiedenen Pigmentarten.

Aus der Untersuchung von KARRER und WEBER folgt, daß der Farbstoff der schwarzen Malve, das sog. „Althaein", uneinheitlich ist, nämlich ein Gemisch von Monoglucosiden des Delphinidin-3′,5′-dimethyläthers (Syringidin), des Delphinidin-3′-monomethyläthers und des Delphinidins. Das erstgenannte Glucosid erwies sich mit dem Weinfarbstoff Oenin als identisch. Die chromatographisch gewonnenen Fraktionen wurden über die Pikrate weiter gereinigt.

a) Trennung von Cyanin- und Paeoninchlorid. Bekanntlich ist Paeonin ein Methyläther des Cyanins und zeigt erheblich geringere Adsorbierbarkeit als der Farbstoff mit drei freien Hydroxylen. Ein aus der rotblühenden Paeonie bereitetes rohes Paeoninchlorid wurde auf nachstehendem Wege von etwas begleitendem Cyaninchlorid befreit und so in ausgezeichnetem Reinheitsgrad erhalten. Die Farbe des von den genannten Forschern gewonnenen Endproduktes schlägt in verdünntem Alkohol auf Zusatz von Ferrichlorid nicht in Violett um; diese Reaktion der, bisher ohne Chromatographie bereiteten Paeoninpräparate ist also auf beigemischtes Cyanin zurückzuführen.

Die Lösung von 1,5 g *Rohpaeonin* in 200 cm³ warmem Wasser wurde auf aktiviertem Al_2O_3 adsorbiert und mit Wasser entwickelt. Oben: purpurfarbige Scheibe, darunter: hellblau; ein beträchtlicher Farbstoffanteil (Paeoninchlorid) ging durch die Säule, als man mit Wasser nachwusch, was bis zur Farblosigkeit des Filtrats fortzusetzen ist. Der oberste Anthocyanring wurde mit etwas HCl-haltigem, warmem Wasser 10—12mal (noch unvollkommen) eluiert und das Eluat im Vakuum auf zirka 20 cm³ gebracht. Den dabei ausgeschiedenen, flockigen Farbstoff hat man mit Wasser, Aceton und Äther nachgewaschen, wieder in Wasser gelöst und nochmals chromatographiert; das Bild war das beschriebene. Die bei dem Konzentrieren des Eluates der obersten Zone erhaltene Farbstoff-Fällung wurde 10—15 Sekunden mit 20 cm³ 0,5 n-HCl aufgekocht, wobei Lösung eintrat. Nach rascher Filtration erschienen bei 0° Krystalle, die aber noch etwas methoxylhaltig waren und deshalb zum dritten Male chromatographiert

wurden. Die schließlich gewonnenen Krystalle (110 mg) gingen beim Erwärmen mit 0,5 n-Salzsäure nur zum kleineren Teil in Lösung; der Rest wurde mit 10 cm^3 Wasser aufgekocht und das Filtrat mit 0,6 cm^3 konz. Salzsäure versetzt. Im Eisschrank krystallisierten 76 mg reines, methoxylfreies *Cyaninchlorid* aus.

Zur Isolierung des *Paeoninchlorids* wurden die während des ersten und zweiten Adsorptionsversuches durch die Kolonne gelaufenen Filtrate gemeinsam im Vakuum bei 30° auf 20 cm^3 eingeengt. Man filtriert den entstandenen krystallisierten Niederschlag ab und scheidet ihn aus 50 cm^3 0,5 n-Salzsäure unter kurzem Aufkochen um. Nach dem Waschen mit Wasser, Aceton und Äther wird das Präparat an der Luft getrocknet. Feine, rote Nadeln, Ausbeute 0,55 g.

b) Aufteilung des „Althaeins". Eine wäßrige Lösung von 2 g Althaeinchlorid wurde durch 80 cm wasserhaltigen Gips gesaugt. Eine Pigmentfraktion blieb oben hängen, die andere lief beim Nachspülen durch. Die letztere Lösung wurde im Vakuum bei 30° stark eingeengt (Fraktion I).

Der fixierte Farbstoffanteil konnte mit sehr verdünnter, warmer Salzsäure eluiert werden. Nach dem Abstumpfen des Säureüberschusses und Konzentrieren im Vakuum wurde nochmals auf Gips chromatographiert. Nun erfolgte eine Scheidung in zwei deutlich verschiedenfarbige Zonen, die im höchsten Bezirk der Säule unmittelbar aufeinander folgten (oben: II., darunter: III. Fraktion). In das Filtrat gelangte jetzt nichts. Elution wie angegeben; die Eluate werden im Vakuum bei 30° stark konzentriert.

Die drei so gewonnenen Farbstofflösungen wurden mit wäßriger Pikrinsäure gefällt und die Pikrate mehrmals aus kochendem Wasser umkrystallisiert. Sie gaben beim Lösen in 2proz. methanolischer Salzsäure und Fällen mit Äther krystallisierte Anthocyanchloride zurück.

Fraktion I erwies sich als das analysenreine Monoglucosid eines Delphinidin-dimethyläthers und wurde mit *Oenin* identifiziert (11,5% OCH_3). Sie löst sich im Wasser mit roter Farbe und gibt keinen Farbumschlag mit Ferrichlorid.

Die Fraktionen II und III waren noch nicht ganz einheitlich, sie scheinen ein Monoglucosid des *Delphinidin-3'-methyläthers* zu sein, mit einer Beimengung von Delphinidin-glucosid, wodurch die

Methoxylzahl herabgedrückt wird (gefunden 5—6% OCH_3). Ferrichloridprobe positiv.

Anhang. Kurze Angabe über die Trennung von *Flavanon*-Abkömmlingen: FUJISE und NAGASAKI.

Weinfarbstoffe. Nachweis von Verfälschungen.

Die nachfolgend referierte Arbeit von MOHLER und HÄMMERLE (1, 2) zeigt deutlich, daß der Chromatographie auch auf dem Gebiet der *Nahrungs-* und *Genußmittel* mannigfaltige Anwendungen bevorstehen.

Die Versuche wurden in den Apparaten Abb. 13, S. 53, auf Aluminiumoxyd (nach BROCKMANN) ausgeführt. Man stellt vorher den Wein durch Zusatz von abs. Alkohol auf einen 50proz. Spritgehalt ein (z. B. 40 cm^3 Wein + 35 cm^3 Alkohol). Die Säule wird vor dem Versuch mit 50proz. Alkohol unter Saugen durchtränkt; die Entwicklung geschieht mit demselben Lösungsmittel (20 cm^3). Ein unverfälschter Rotwein lieferte das in Abb. 27 wiedergegebene Chromatogramm, dessen Zone 3 durch die alkalische Wirkung des Adsorbens hervorgerufen wurde; das Filtrat zeigte äußerst schwache Blaufärbung. Die Zonen 1 und 2 wurden gemeinsam, mit Hilfe einer 2proz. Weinsäurelösung in 50proz. Alkohol fünfmal eluiert und der colorimetrischen sowie der spektrophotometrischen Messung unterzogen.

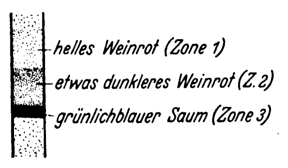


Abb. 27. Chromatogramm eines Rotweines.

Der *Nachweis von zugesetztem Teerfarbstoff* (Bordeauxrot) gelingt in einem analog geleiteten Versuch, wobei das fremde Pigment durch die Säule geht und im Filtrat quantitativ bestimmt werden kann. Eine besondere Voraussetzung hierfür ist der richtige Gesamtsäuregehalt des Weines (berechnet als „Weinsäure"), welcher entsprechend einzustellen ist. Beträgt z. B. die Konzentration des zugesetzten Bordeauxrots 0,025‰, so darf die Weinsäure-Konzentration nicht unter 5‰ liegen, da sonst auch der Teerfarbstoff mit adsorbiert wird und eine Lage unterhalb der natürlichen Pigmente einnimmt. Auch von der Gerbsäure wird das Verhalten beeinflußt (Tabelle 17, S. 149).

In einem Falle konnte der *Zusatz von Weißwein zum Rotwein,*

welcher mit Hilfe eines Teerfarbstoffes überdeckt war, chromatographisch erwiesen werden, nämlich durch die abnormal niedrigen Farbstärken der Zonen 1 und 2, nachdem das Kunstprodukt in das Filtrat gegangen ist.

Tabelle 17. Chromatographisches Verhalten von Bordeauxrot in 50proz. alkoholischer Lösung, in Gegenwart von Weinsäure und Tannin.

Gehalt der Lösung an			Ergebnis
Weinsäure ‰	Tannin ‰	Farbstoff ‰	
5	0	0,025	Keine Adsorption.
5	1	0,025	Nur Tannin wird fixiert.
5	2,5	0,025	Farbstoff und Tannin größtenteils adsorbiert; nur der erstere mit 50proz. Alkohol eluierbar.
5	4	0,025	
10	4	0,025	
10	4	0,050	Farbstoff und Tannin adsorbiert; Farbstoff mit 50proz. Alkohol kaum eluierbar.

9. Sonstige natürliche Farbstoffe.

(Indirubin und Indigo s. S. 187.)

Pilzfarbstoffe.

Aus dem echten Reizker (Wacholder-Milchling, *Lactarius deliciosus*) hat WILLSTAEDT (6, 7) auf chromatographischem Wege zwei Pigmentkomponenten gewonnen. Der Hauptfarbstoff ist das *Lactaro-violin* $C_{15}H_{14}O$; ferner wurde ein flüssiger Kohlenwasserstoff, nämlich ein blaues *Azulen* $C_{15}H_{18}$ herausgearbeitet, das, im Wege einer Al_2O_3-Chromatographie, auch aus Kamillenöl (in Petroläther) erhalten werden kann („Chamazulen"). Das letztgenannte Pigment hat sich wohl erst im Verlaufe der Bearbeitung des Pilzes an der Luft gebildet.

Lactaro-violin. 3 kg Pilze werden zerrieben, 1 Tag in 2 l Alkohol stehen gelassen, durch ein Tuch filtriert und gepreßt. Wiederholung mit 1 l Alkohol. Man gießt die Lösung durch Faltenfilter, versetzt sie mit $^1/_2$ Vol. Äther + Wasser und läßt die rote Ätherlösung mit $^1/_{20}$ Vol. alkoholischem Natron über Nacht stehen, wobei eine farblose, flockig-krystallinische Masse erscheint.

Man dekantiert die Ätherlösung, wäscht sie alkalifrei, trocknet, dampft ab und nimmt den Rückstand mit Petroläther auf. Die filtrierte Lösung wird dann auf Aluminiumoxyd (standardisiert, nach BROCKMANN) aufgeteilt (entwickeln mit Benzol + Petroläther 1 : 5). Oben: schmal, grünlichgrau, darunter der rote Hauptfarbstoff, aus welchem beim Entwickeln eine rein blaue Komponente nach unten wandert. Man eluiert die Hauptzone mit Petroläther + Methanol und chromatographiert nochmals. Wird das mit Wasser gewaschene, rotviolette zweite Eluat stark eingeengt, so krystallisiert im Eisschrank das Lactaro-violin aus. Umkrystallisieren aus Petroläther + etwas Benzol. Stäbe, Schmelzp. 53°.

Azulene. Die zweimal mit Sprit extrahierten Pilzschnitzel (S. 149) werden mit Aceton übergossen (Blaufärbung), nach 1 Tag abgepreßt und nochmals mit Aceton ausgezogen. Man entmischt die tiefblaue Lösung mit Benzin und Wasser, schüttelt die untere Phase nochmals mit Benzin und wäscht die blauen Benzinauszüge acetonfrei. Die getrocknete Lösung wurde in der Aluminiumoxyd-Säule verarbeitet:

Dünne Ringe: violett, braungelb, schwarz, purpur (Lactaro-violin), olivgrün,
breit, hellblau: „Azulen II",
breit, intensiv blau: Lactar-azulen (Hauptfraktion),
orange, geht leicht in das Filtrat.

Man eluiert die Hauptfraktion mit Petroläther + Holzgeist, wäscht den Alkohol weg, verjagt den Petroläther im Stickstoffstrom und destilliert das *Lactar-azulen* $C_{15}H_{18}$ in gutem Vakuum. Siedep. (2,5—3 mm) 155—160°. Gibt in Alkohol mit 1,3,5-Trinitrobenzol tiefschwarze Nadeln (Additionsprodukt): 4,5 g, aus 30 kg frischem Pilz.

Beispiel. Das aus Cyclopentano-cycloheptanon mit Mg + Brombenzol erhaltene Gemisch wurde mit S dehydriert (170—240°, 100 mm, $^3/_4$ Stunden) und der destillierbare Teil zweimal chromatographiert (Petroläther, Al_2O_3). Braune Begleiter blieben hängen; das rein blaue Filtrat enthielt *Azulen* und farblose Kohlenwasserstoffe.

Ferner lassen sich die bei der Schwefel- oder Selen-*Dehydrierung* aus Sesquiterpenen entstehenden Rohazulene chromatographisch reinigen (PFAU und PLATTNER).

Harzfarbstoffe.

Aus indischem *Palmdrachenblut* (*Sanguis draconis*), einem pflanzlichen Exkret, das bei der Lackfabrikation verwendet wird, haben BROCKMANN und HAASE den tiefroten Hauptfarbstoff *Dracorubin* $C_{18}H_{14}O_3$ folgend gewonnen.

1 kg feinpulvriges Material (Merck) wurde in 250-g-Portionen mit 1,5 l Benzol ausgekocht und nach dem Erkalten filtriert (Rückstand 90 g). Das Filtrat blieb nach Zusatz von 10 g Pikrinsäure über Nacht stehen. Man saugt das braune Pikrat ab, kocht es gründlich mit Benzol aus, schüttelt es zweimal je 1 Stunde mit Benzol auf der Maschine, nutscht und trocknet an der Luft. Die Niederschläge aus 1 kg Harz wurden in $^1/_2$ l Methanol suspendiert, am Wasserbad erwärmt und mit 40 g KOH in 100 cm^3 Wasser versetzt. Nach kurzem Erwärmen saugt man das freigelegte, rohe Dracorubin ab, wäscht es mit Wasser gut aus, suspendiert es nochmals in Wasser und trocknet im Vakuum über $CaCl_2$. Ausbeute 36 g, Schmelzp. 287°.

Zur Reinigung wurde in Chloroform, auf standardisiertem Al_2O_3 chromatographiert. Die unterste, schmale, braune Zone des mehrschichtigen Chromatogramms wurde mit Chloroform herausgewaschen und darauf das Dracorubin aus der leuchtend roten Hauptschicht mit methanolhaltigem Chloroform eluiert. Man dampft ab, löst den Rest in Benzol + Methanol 9 : 1 und engt die Flüssigkeit bis zur Krystallbildung ein. Aus Benzol umkrystallisiert: granatrote Prismen, Schmelzp. 315°; chromatographisch einheitlich.

Gleichzeitig mit BROCKMANN und HAASE hat sich auch HESSE mit dem Drachenblutpigment beschäftigt. Zu seiner nachstehend referierten Untersuchung sei vermerkt, daß dort der Hauptfarbstoff als „Dracocarmin“ ($C_{31}H_{26}O_5$) und ein Nebenfarbstoff als „Dracorubin“ ($C_{28}H_{24}O_7$) bezeichnet wird.

580 g Harzpulver (Fa. Caesar und Loretz) wurden im Extraktor mit Äther erschöpft und die Lösung mit 1 Raumteil Petroläther gefällt. Man löst den dunkelroten Niederschlag in 500 cm^3 Amylalkohol und schüttelt die Flüssigkeit abwechselnd mit n-Soda und mit Wasser, bis ihr nichts mehr entzogen wird. Beim nachherigen Schütteln mit 2 n-HCl schlägt die tiefrote Farbe in Braun um. Man engt die amylalkoholische Lösung im Vakuum

auf 200 cm³ ein und fällt die Farbstoff-Chlorhydrate mit Äther (hellbraun, 15 g). Die letzteren werden in 200 cm³ Chloroform aufgenommen und mit 2 n-Soda durchgeschüttelt (Farbe wieder tiefrot). Man filtriert von einem geringen Niederschlag, trocknet und chromatographiert auf Al_2O_3 (nach BROCKMANN, 35 × 4,5 cm):

Oben: (braun),
ganz dunkel rot,
rot, enthält den Hauptfarbstoff „Dracocarmin",
(gelbrot),
(rosa),
unten: (braun).

Die drei untersten Bezirke lassen sich mit Chloroform in das Filtrat treiben; man wechselt die Vorlage und wäscht die breite Dracocarmin-Zone durch die Säule; dieser Pigmentanteil krystallisiert sofort, wenn man den Abdampfrückstand der Chloroformlösung mit wenig Chloroform oder Alkohol aufkocht. Glitzernde Krystalle, Schmelzp. 293°; Krystall-chloroform bzw. -alkohol anwesend. Die Verbindung bildet ein orangegelbes Chlorhydrat.

Das weitere Entwickeln mit Chloroform ändert am Chromatogramm nichts Wesentliches, wäscht man es aber mit Chloroform + Alkohol (1 : 1), so löst sich eine tiefrote Scheibe von dem dunklen Bezirk ab und wandert in das Filtrat: „Dracorubin" (sehr schwer löslich, wird aus Alkohol krystallisiert, besser über das Chlorhydrat gereinigt). In der Säule bleiben sechs verschieden gefärbte Zonen zurück, die diffus ineinander fließen und teilweise krystallisierbaren Farbstoff enthalten.

Viertes Kapitel.

Anwendungen auf künstliche Farbstoffe.

Teerfarbstoffe verschiedener Art haben RUGGLI und JENSEN (1, 2; vgl. auch JENSEN) untersucht. Die theoretischen Ergebnisse dieser Arbeit wurden schon S. 33 besprochen.

a) Adsorptionsverhalten einiger **basischer Farbstoffe**, in wäßriger Lösung, auf aktiviertem Aluminiumoxyd:

Stärkste Ads. Viktoriablau B,
Methylenblau D, Patentphosphin G,
Krystallviolett 5 BO, Fuchsin G, Safranin OO,
Brillantgrün, Malachitgrün,
schwächste Ads. Auramin O.

Diese 9 Farbstoffe wurden in den möglichen 36 Zweierkombinationen untersucht, von denen in 32 Fällen scharfe Trennung sich erzielen ließ. Ungünstig fiel die Probe nur bei den folgenden 4 Paaren aus: Auramin + Malachitgrün, Brillantgrün + Malachitgrün, Patentphosphin + Methylenblau und Fuchsin G + Safranin.

In manchen Fällen gelingt auch die Trennung von Dreiergemischen (farbige Abbildungen im Original), z. B.:

Oben: schwarzblau: Viktoriablau } scharfe, dünne Zonen,
violettblau: Methylenblau }
unten: gelb, ausgebreitet, wegwaschbar: Auramin O.

Ersetzt man das Methylenblau mit Fuchsin, so entsteht ein analoges Säulenbild.

b) Bei einer Anzahl von **Säurefarbstoffen** ergab sich die folgende Reihe *(die Pfeile zeigen die Kupplungsrichtung an)*:

Stärkste Ads. {Tuchechtschwarz B (1-Naphtylamin-5-sulfosäure → α-Naphtylamin → Phenyl-peri-Säure) und
Tuchechtblau B (Anilin → Cleve-Säure → Phenyl-peri-Säure),
(betr. Adsorbierbarkeit mit dem Vorangehenden fast identisch),
{Helvetiablau (Triphenylrosanilin-trisulfosäure) und
Orange II (Sulfanilsäure → β-Naphtol),
Naphtolgelb S (7-Sulfosäure des Martiusgelb),
{Erioglaucin supra (saurer Triphenylmethan-Farbstoff) und
schwächste Ads. Xylenrot B (sulfoniertes Rhodamin).

c) Substantive Farbstoffe. Mono- und Disazofarbstoffe.

Diaminrosa FFB (Dehydro-thiotoluidin → 1-Chlor-8-naphtol-3,6-disulfosäure): dünne violette Zone, violett und schwach violett, die letzteren gut auswaschbar („Filtrate")[1].

[1] Als „Filtrate" werden schwach fixierte, leicht auswaschbare Komponenten bezeichnet, und zwar auch dann, wenn sie vorübergehend eine gut definierte Farbschicht bilden. Charakteristisch ist das rasche Abwärtswandern solcher Bestandteile.

Erika G extra (Dehydro-thioxylidin → G-Säure): breit hellrot, dann blaues, karminrotes, violettes „Filtrat“, mit weißen Zwischenräumen.

Erika B (Dehydro-thioxylidin → ε-Säure): schmutzig-gelbe Zone, dann Filtrate: violett, rosa, rosa (Formeln S. 36).

Als Beispiel für die *Chromatographie eines bekannten Handelsfarbstoffes* sei das *Kongorot technisch* angeführt. Nach RUGGLI und JENSEN (1) liefert es in Pyridin ein zusammengedrängteres Bild, in Wasser eine mehr auseinander gezogene Schichtung. Die Zonenfolge war stets die gleiche:

100 cm^3 der 2proz. Lösung wurden allmählich in die Al_2O_3-Säule eingeführt und mit 1,5 l Wasser entwickelt.

Oben: a) schmal, rotviolett,
b) rosafarbig, breit,
c) stark rot, Hauptzone,
unten: d) breit, gelborange.

Nach dem Zerschneiden wurden die Anteile mit kochendem Wasser eluiert und verdampft. Die Isolierung erfolgte teils direkt, teils durch *Auffärben* auf mercerisierte Baumwolle, Abziehen mit kochendem Wasser, Eindampfen und Umkrystallisieren aus Methanol. Die Operationen wurden nach Bedarf wiederholt und variiert. Die Zone a gab wenig dunkelrotes Pulver, das auf mercerisierter Baumwolle eine kräftige bräunlichrote Färbung zeigt; b liefert ein dunkelrotes Pulver, Ausfärbung rot, säureempfindlich; aus c: dreimal umkrystallisiert, rotes Pulver (Hauptmenge), Ausfärbung starkes, reines Rot, säureempfindlich; d: etwas orangerotes Pulver, auf Baumwolle gelborange, beständig gegen verdünnte Essigsäure; wird mit 5proz. HCl nur rotviolett.

Das *Kongorot rein* (dreimal aus Wasser + Alkohol umkrystallisiert, salzfrei) war chromatographisch einheitlich. Nach Zusatz von *Salz* (2 g NaCl zu $^1/_3$ g Farbstoff in 100 cm^3 Wasser) bildete das meiste gleichfalls eine wandernde Schicht, die etwas mehr als sonst zusammengedrängt war. Oben verblieb nur eine dünne Zone.

Benzopurpurin 4 B (Tolidin → 2 Mole Naphtionsäure) war adsorptiv einheitlicher als Kongorot.

Benzoazurin G (Dianisidin → 2 Mole 1-Naphtol-4-sulfosäure):

Oben: dunkelblau, hellblau, breit } Ausfärbung wie das Handelsprodukt,
graublaues Filtrat, liefert violette Färbung, bügelechter als das Handelsprodukt,
unten: rotes Filtrat, gibt braunviolette Ausfärbung.

Die Verschiebung der Nuance nach Rot ist vielleicht auf Polydispersität zurückzuführen, da der gleiche Effekt auch durch Bügeln der Ausfärbung, Erhitzen der Lösung oder Zusatz von Alkohol erzielt werden kann.

Direkthimmelblau grünlich (= Diaminreinblau; Dianisidin → 2 Mole 1-Amino-8-naphtol-2,4-disulfosäure). 100 cm³ 2proz. Lösung in der Al_2O_3-Säule (21 × 6,5 cm), mit 1,5 l Wasser entwickelt:

Oben: blaugrün, nach unten schwächer, grünstichig-blaue Ausfärbung,
kräftig violettes Filtrat, Ausfärbung blauviolett, bügelunecht,
unten: kräftig blaues Filtrat (Hauptmenge), auf Baumwolle tiefblau.

Bei den folgenden Trisazo- und Tetrakisazo-Farbstoffen zeigten sich verwickeltere Chromatogramme (Reihenfolge der Zonen von oben nach unten):

Dianilschwarz PR (*m*-Phenylendiamin ← *γ*-Säure ← Benzidin-monosulfosäure → *γ*-Säure → *m*-Phenylendiamin): schwarz, blauschwarz, weiß, schmutzig-hellgelbes Filtrat, weiß, fleischfarbig, dann gelber Ring (beide leicht auswaschbar).

Cupranilbraun B: schokoladebraun, anschließend gelbbraun, weiß, rotgelbes Filtrat, weiß, violett, gelb, weiß, hell gelbbraun, leicht auswaschbar.

Hessisch Braun 2 BN (Sulfanilsäure → Resorcin ← Benzidin → Resorcin ← Sulfanilsäure): gelbbraun, violett, weiß, rotgelb, gelbes, dann violettes Filtrat.

Direktbraun J (*m*-Aminobenzoesäure → *m*-Phenylendiamin ← *m*-Phenylendiamin → *m*-Phenylendiamin ← *m*-Aminobenzoesäure): tiefbraun, gelbbraun, schwachbraun, rotbraunes Filtrat, weiß, rotgelbes Filtrat, schwach gelb, kanariengelb, weiß, braungelbes Filtrat.

Gemische der obigen Farbstoffe. Wie schon S. 33 erwähnt, gelingt die Trennung im allgemeinen gut, wenn die Anzahl der Azogruppen verschieden ist (z. B. Kongorot + Diaminrosa FFB), hingegen versagt die Methode bei sehr ähnlichen Komponenten, wie Erika B + Erika G extra, oder Kongorot + Benzopurpurin. Direkthimmelblau grünlich bleibt im Chromatogramm höher hängen als Direktblau 2 B (Strukturformeln auf S. 36).

Da die Adsorption von Direktblau 2 B an Baumwolle bekanntlich stark vom *Salzzusatz* abhängt, haben Ruggli und Jensen (1) untersucht, ob etwa auch das Chromatogramm sich umkehrt,

wenn z. B. eine 8proz. NaCl-Lösung statt Wasser verwendet wird. Dies war jedoch nicht der Fall, man sah lediglich ein Zusammendrängen der Hauptzonen, bis zur Untrennbarkeit.

Fünftes Kapitel.

Anwendungen auf farblose und schwachgefärbte Substanzen.

1. Verschiedene aliphatische und hydroaromatische Verbindungen.

a) Reinigung des Hentriakontans $C_{31}H_{64}$ von Spuren des Dipalmitylketons $C_{15}H_{31} \cdot CO \cdot C_{15}H_{31}$ (Winterstein und Stein 1).

Im unverseifbaren Anteil von zahlreichen Pflanzenextrakten kommen diese Stoffe gemeinsam vor und können sonst nur auf umständlichem Wege geschieden werden. Dagegen gelingt die Trennung leicht im chromatographischen Versuch. Man sieht auch hier, daß der Reinheitsgrad von Substanzen, die auf Grund anderer Methoden bereits als „chemisch rein" bezeichnet werden, unter Umständen noch erhöht werden kann.

300 mg Hentriakontan (Schmelzpunkt und Elementarzusammensetzung richtig) wurden in 100 cm³ Benzin gelöst und durch eine Säule (6 × 1 cm) von Aluminiumoxyd + Fasertonerde (5 : 1) sickern lassen. Nachwaschen mit 200 cm³ Benzin. Der Kohlenwasserstoff ging durch das Adsorbens, das dann mit methanolhaltigem Petroläther einige Zeit stehen gelassen und mit Petroläther + Methanol nachgewaschen wurde. Der Trockenrückstand des Eluats bestand aus 2 mg Dipalmitylketon; der Schmelzpunkt des regenerierten Hentriakontans war deutlich schärfer als derjenige des Ausgangsproduktes.

b) Trennung von Geraniol $C_{10}H_{17}OH$ und Limonen $C_{10}H_{16}$ (Winterstein und Stein 1).

Das Gemisch von je 4 g wurde in 700 cm³ Benzin (Siedep. 70°) gelöst und auf aktiviertem Aluminiumoxyd chromatographiert (12 × 5,5 cm). Entwickeln mit 300 cm³ Benzin. Den adsorbierten

Anteil eluiert man mit methanolhaltigem Petroläther (Siedep. 30 bis 50°). Sowohl das Filtrat als auch das Eluat wurden unter Anwendung einer WIDMER-Spirale auf dem Wasserbad möglichst vom Benzin befreit, das restliche Lösungsmittel vorsichtig bis auf etwa 100° abgetrieben und der Rückstand, ohne einen Vorlauf abzutrennen, überdestilliert. Aus dem Filtrat ließ sich auf diesem Wege Limonen gewinnen, aus dem Eluat Geraniol.

Die Trennung von *Cineol* $C_{10}H_{18}O$ und *Dipenten* $C_{10}H_{16}$ gelingt nach demselben Verfahren.

c) Trennung von Oleanol $C_{29}H_{47}OH$ und Oleanylen $C_{29}H_{46}$ (WINTERSTEIN und STEIN 1).

Die Scheidung dieser Vertreter der Sapogeninreihe läßt sich durch fraktionierte Krystallisation nur in zeitraubender Weise und unter großen Verlusten durchführen.

Das Decarboxylierungsprodukt der Oleanolsäure wurde in Benzin gelöst, von unveränderter Säure abgetrennt und durch dreimaliges Waschen mit gesättigter Barytlösung entsäuert. Man saugt die getrocknete Lösung durch Aluminiumoxyd (aktiviert; 14 × 4,5 cm) und wäscht mit zirka 400 cm³ Benzin nach. Das Filtrat lieferte nach dem Eindampfen und Umkrystallisieren (aus Aceton) 2,5 g Oleanylen. — Das adsorbierte Oleanol wurde mit Äther + Methanol aus der Säule eluiert und sein Abdampfrückstand gleichfalls aus Aceton krystallisiert. Ausbeute 2,5 g, Schmelzp. 212—216°.

d) Die Reinigung des rohen Sarsa-sapogenins

gelingt nach ASKEW, FARMER und KON am besten, wenn eine 4—5proz. Benzollösung durch die Aluminiumoxyd-Säule (aktiviert, Merck) gesaugt wird. Verunreinigungen blieben im Adsorbens zurück. Der Vakuum-abdampfrückstand des Filtrates wird aus Aceton umkrystallisiert. Schmelzp. 197—198°; $[\alpha]_D = -75°$.

e) Untersuchung des unverseifbaren Restes von Ölen und Fetten.

Zur Bearbeitung derartiger Gemische ist die selektive Adsorption oft angewandt worden, namentlich aus Benzin- oder Benzin-Benzol-Lösung. Einschlägige Arbeiten findet man auf dem

Gebiete des Lipochroms (S. 105, 116, vgl. ZECHMEISTER und TUZSON 4, 8, s. auch die Darstellung von E-Vitamin-Konzentrat aus Weizenkeimöl S. 185). In zahlreichen Fällen würden große Sterinmengen stören; man entfernt sie vor der Chromatographie durch Ausfrieren oder nach einem anderen Verfahren, wenn auch weitaus nicht quantitativ. Der Rest des Sterins wird dann meist in den oberen Säulenteilen festgehalten.

Nachdem THORBJARNARSON und DRUMMOND auf diesem Wege *Squalen* $C_{30}H_{50}$ aus Olivenöl herausgearbeitet haben, wurde von THORBJARNARSON, RUIZ und DRUMMOND der unverseifbare Rückstand einiger mariner Öle chromatographiert (Haifischleberöl, Heringsöl, Rattenfischöl aus *Chimaera monstrosa*; vgl. auch DRUMMOND, RUIZ und THORBJARNARSON). Unter den angewandten Bedingungen gehen gesättigte und ungesättigte Kohlenwasserstoffe, namentlich das Squalen, leicht durch die Säule, ebenso auch Carotin. Dagegen bleiben gesättigte Alkohole meist ganz oben hängen, während gewisse ungesättigte tiefer vordringen; besonders ist dies in Anwesenheit von viel Squalen der Fall. Sterine und Polyenalkohole belegen einen verhältnismäßig gut ausgeprägten Bezirk, z. B. an der Grenze des oberen Säulendrittels.

Beispiel: Der unverseifbare Rest eines grönländischen Haifischleberöles (Steringehalt 25%) wurde durch Abkühlen der Methanollösung (sowie der eingeengten Mutterlaugen) auf 0° von Cholesterin und Batylalkohol $C_{21}H_{42}O_3$ befreit und die so vorgereinigte Substanz (6% des Rohöles) in wenig Petroläther (Siedep. 40—60°) auf Al_2O_3 (Merck) gegossen; entwickeln mit demselben Solvent:

Oben:	1. Zone,	Gewicht	1,79 g,	Jodzahl	77,0	(blaßgelb, dickflüssig),
	2. „	„	2,05 g,	„	72,3	(gelb, dickflüssig),
	3. „	„	2,95 g,	„	75,9	(halbfest, dunkelbraun),
	4. „	„	2,18 g,	„	82,5	(gelbliches, dickes Öl)
unten:	im Filtrat,	„	1,74 g,	„	152,5	(dünn, kaum gefärbt).

Die ziemlich gut erkennbaren Zonen ließen sich mit Methanol + Äther eluieren. Durch Umscheiden aus Methanol isolierte man aus Zone 1 etwas *Batylalkohol* und aus 2 ein wenig Sterin, doch bestand der Hauptanteil des adsorbierten Materials aus dem ungesättigten *Selachylalkohol* $C_{21}H_{40}O_3$. Nachdem nämlich alle feste Substanz mit Hilfe von Methanol, wie erwähnt, entfernt wurde, ergab die katalytische Hydrierung des Restes quantitativ Batyl-

alkohol. — Die hohe Jodzahl des Filtrates deutet auf *Squalen*, und tatsächlich konnte das Chlorhydrat desselben durch Behandlung mit HCl in trockenem Aceton erhalten werden (typische Krystalle, Schmelzp. 112—114°).

Man sieht, daß die Chromatographie des unverseifbaren Restes von Fetten noch verbesserungsbedürftig ist, namentlich in bezug auf den präparativen Ertrag.

f) Die Trennung von Zuckerarten

ist noch kaum bearbeitet. Aus einer Mitteilung von HAYASHI folgt, daß z. B. die Scheidung von Rohr- und Traubenzucker auf Blutkohle in alkoholischer Lösung möglich wäre.

g) Acetylcellulose.

Die nachstehend referierte Arbeit von MARK und SAITO eröffnet den Weg zur Untersuchung und Aufteilung von *hochpolymeren Substanzen* in der Adsorptionskolonne. Als erstes Beispiel wurde technisches Celluloseacetat (Cellit) geprüft. Es zeigte sich, daß derartige Stoffe in Komponenten zerfallen, welche durch *abweichende Viskositäten* gekennzeichnet sind. Da der Acetylgehalt nicht variiert, erfolgte die Fraktionierung hauptsächlich nach den verschiedenen *Kettenlängen* der Polymerhomologen.

Auf ein Glasrohr (42 × 3 cm) wurde eine Kappe aus Messingdrahtnetz angepaßt, Glaswolle und Asbest eingelegt und als Füllmasse dreimal 10 g Blutkohle (Kahlbaum) verwendet; zwischen je zwei Portionen des Adsorbens befanden sich runde Leinwandstücke. Man behandelt die Säule mit Preßluft (zirka 1 Atm.), gießt 300 cm^3 acetonische 0,5proz. Cellitlösung ein und setzt wieder die Preßluft an. (Die Adsorption des Acetons ist mit einer fühlbaren Wärmeentwicklung verbunden; wurde die Kohle vorher mit dem Lösungsmittel befeuchtet, so verläuft das Durchsickern zwar gleichmäßiger, doch wird die adsorbierte Cellitmenge zu gering.) Man entwickelt so lange mit Aceton, bis keine Acetylcellulose mehr in das Filtrat geht, dessen Abdampfrückstand dann getrocknet wird.

Die drei abgeteilten Bezirke der Kolonne werden für sich getrocknet und mit je 50 cm^3 Dioxan $(CH_2)_4O_2$ eluiert (Schütteln, eintägiges Stehen). Die schwierige Filtration ließ sich durch

ein 1,5 cm breites Glasrohr ausführen, das mit Glaswolle, Asbest und 7 g Stärke fest gestopft war. Man dampft die Eluate bei 60° ein und läßt den Rest im Vakuumexsiccator über P_2O_5 und Blutkohle stehen. Nun ist das Material für die Viskositätsmessung bereit.

Tabelle 18 zeigt, daß hier in der Tat eine Fraktionierung gelungen ist: niedriger viskose Anteile werden im oberen Drittel der Füllmasse festgehalten, während die höchst viskose Komponente in das Filtrat geht.

Tabelle 18. Aufteilung von Cellit und relative Viskosität der Fraktionen, in 0,1proz. Acetonlösung (für Aceton $\eta_r = 1{,}122$).

	Cellit „L 700" ($\eta_r = 1{,}090$)		Cellit „L 1000" ($\eta_r = 1{,}163$)	
	Enthält Prozent des Ausgangsstoffes	Viskosität	Enthält Prozent des Ausgangsstoffes	Viskosität
Oberste Zone	30—35	1,049	30—35	1,101
Mittlere Zone	30—35	1,065	25—35	1,135
Unterste Zone . . .	20—25	1,067	20—30	1,138
Filtrat	5—10	1,097	10—15	1,198

2. Einfachere Benzolderivate.

a) Das Verhalten einiger Phenole im Ultra-chromatogramm.

Nach GRASSMANN und LANG zeigen in methanolischer Lösung z. B. die folgenden Phenole fluoreszierende, einheitliche Ultrachromatogramme:

Phenol oder Brenzcatechin: auf Al_2O_3 oder MgO schwach violett.
Resorcin: auf Al_2O_3 oder MgO hell blauviolett.
Gallussäure: auf Al_2O_3 oder MgO tiefviolett.
Phloroglucin: auf Al_2O_3 gelb (braunstichig), auf MgO gelb.

Chromatographie nach Zusatz von $FeCl_3$: S. 70.

b) Trennung von *o*-, *m*- und *p*-Nitranilin sowie der Nitrophenole (KARRER und NIELSEN).

Je 0,15 g wurden gemeinsam in Petroläther gelöst, auf Calciumhydroxyd gegossen und mit Petroläther zum Chromatogramm entwickelt:

Oben: hellgelb, enthält *p*-Nitranilin,
gelb: *m*-Nitranilin,
unten: dunkelgelb bis bräunlich: *o*-Nitranilin.

Die Isolierung geschah durch Eluieren mit methanolhaltigem Benzol, Eindampfen und erneuerte Adsorptionsanalyse des Rückstandes.

Ähnlich lassen sich auch die drei *Nitrophenole* trennen (Benzol, Aluminiumoxyd- oder Calciumcarbonat-Säule), wenn der Versuch wiederholt wird. Die von oben nach unten geltende Reihenfolge ist auch hier: *p*-, *m*-, *o*-Verbindung.

c) 3,5-Dimethyl-6-nitroanilin aus 3,5-Dimethyl-anilin (KARRER und STRONG 2).

Die Lösung von 8,3 g 3,5-Dimethyl-anilin in 45 cm³ konz. Schwefelsäure wurde zwischen 0° und 5° mit 6,64 g HNO_3 ($d = 1{,}4$) + 7 cm³ konz. H_2SO_4 nitriert. Beim Aufgießen auf Eis: orangegelbe Fällung. Man macht die Suspension mit starkem KOH alkalisch und extrahiert den gelben Niederschlag mit Äther. Der letztere wird gewaschen, mit Pottasche getrocknet, filtriert und verdampft. Man zieht den öligen Rest mit 2 × 400 cm³ siedendem Petroläther aus.

Der Extrakt wurde auf Calciumhydroxyd chromatographiert und so lange mit Petroläther nachentwickelt, bis der größte Teil der farbigen Verbindungen durch die Säule ging; nur im obersten Bezirk verblieb eine schmale, gelbe Schicht. Der Abdampfrückstand des Filtrates wurde mehrmals mit je 100 cm³ Petroläther erschöpft, welcher filtriert und eingeengt, beim Abkühlen 3,5-Dimethyl-6-nitroanilin abschied. Ausbeute 4,8 g. Gelbe Nadeln, Schmelzp. etwa 45° (vielleicht noch nicht ganz rein).

d) Schiffsche Base aus 3,5-Dimethyl-6-nitroanilin und l-Arabinose (KARRER und STRONG 2).

16 g Zucker, 4 g Nitrokörper und 200 cm³ abs. Methanol wurden in der Druckflasche 6 Stunden auf 105—115° erhitzt (Auflösen). Man ließ stehen, filtrierte die dabei auskrystallisierte, unveränderte Arabinose ab und chromatographierte das Filtrat auf Aluminiumoxyd; Nachwaschen mit abs. Alkohol. Unverändertes Nitroanilin lief durch die Kolonne, welche eine ausgebreitete gelbe Schicht

zurückhielt. Die letztere ließ sich mit viel heißem 80proz. Methanol eluieren. Nach dem Einengen im Vakuum schießt die SCHIFFsche Base hervor und wird aus Alkohol umkrystallisiert. Ausbeute 1 g, Schmelzp. 165 bis 166°.

NO_2

CH_3— —$N{=}CH(CHOH)_3CH_2OH$

CH_3

Schiffsche Base aus 3,5-Dimethyl-6-nitroanilin und l-Arabinose.

e) Schiffsche Base aus 4,5-Dimethyl-2-nitroanilin und l-Arabinose.

Im Verlaufe von synthetischen Flavinarbeiten haben KUHN, REINEMUND, WEYGAND und STRÖBELE Pentosen mit einem Nitroxylidin (1,2-Dimethyl-4-nitro-5-aminobenzol) kondensiert. 0,5 g l-Arabinose und 2,2 g Nitroxylidin wurden mit 30 cm³ abs. Alkohol 6 Stunden auf 110—120° erhitzt. Die erkaltete, orangerote Lösung saugte man durch eine Al_2O_3-Säule (Merck) und entwickelte mit wasserfreiem Alkohol nach. Das im Überschuß angewandte Nitroxylidin ging leicht in das Filtrat und krystallisierte aus. Die breite, orangefarbige Scheibe des Kondensationsproduktes wurde mit 80proz. Methanol eluiert, das Eluat auf $^1/_5$ eingeengt und das Ausgefallene aus Wasser umkrystallisiert. Ertrag 0,58 g, Schmelzp. 166°, orangegelbe Prismen. Hier konnten die unveränderten Ausgangsmaterialien nach einmaliger Chromatographie quantitativ zurückgewonnen und von neuem verwendet werden.

CH_3— —$N{=}CH(CHOH)_3CH_2OH$

CH_3— —NO_2

Schiffsche Base aus 4,5-Dimethyl-2-nitroanilin und l-Arabinose.

f) 1,2-Dimethyl-4-nitro-5-amino-benzol-d-glucosid.

Die Isolierung dieses durch Umglucosidierung entstehenden Nitroxylidin-Glucosids gelingt nach KUHN und DANSI folgend: 1,35 g *p*-Toluidin-glucosid und 4 g 1,2-Dimethyl-4-nitro-5-aminobenzol wurden in 150 cm³ abs. Alkohol 8 Stunden am Rückfluß gekocht und die orangerote Lösung auf eine Al_2O_3-Säule gegossen. Man eluiert die obere, orangerote Zone mit Pyridin-Methanol-Wasser, verdampft im Vakuum und krystallisiert den Rest aus Alkohol. Ertrag 0,15 g, Schmelzp. 213° (Zersetzung).

g) Bestimmung des Adrenalins im Blut (WHITEHORN).

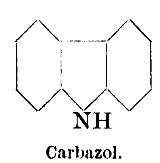
7—10 cm^3 frisches Blut werden ohne Verzug in 10 Vol. 3proz. Trichloressigsäure gegossen. Man läßt 15 Minuten bis einige Stunden stehen, filtriert oder zentrifugiert und saugt das Klare durch eine Säule von reiner Kieselsäure (Acidum silicic.; Rohrmaße 20 × 2 cm), welche vorher mit 50proz. Schwefelsäure $^1/_4$ Stunde ausgekocht und 10—12mal mit Wasser dekantiert wurde. Die Kolonne wird zunächst mit Wasser gewaschen, dann mit 1—3 cm^3 Natriumbisulfit (5 g wasserfreies Salz in 50 cm^3 Wasser), bis das Abtropfende neutral oder alkalisch auf Bromthymolblau reagiert. Andererseits wird das Filtrat von der Trichloressigsäurefällung (entsprechend 5 cm^3 Blut) mit n-NaOH auf ungefähre Neutralität eingestellt (Bromthymolblau) und mit 1 cm^3 Pufferlösung versetzt (17,4 g Dikalium- und 6,8 g Monokaliumphosphat in 100 cm^3 Wasser). Man saugt diese, vorher filtrierte Flüssigkeit durch das Rohr (3 Tropfen/Sek.) und entwickelt dreimal mit je 8 cm^3 frisch aufgekochtem und abgekühltem dest. Wasser. Unter den angegebenen Bedingungen wird das Adrenalin (Epinephrin) adsorbiert, während Glutathion und andere nicht basische oder zu schwach basische Stoffe in das Filtrat gelangen. Man eluiert das Adrenalin mit 5 cm^3 $^2/_3$ n-H_2SO_4 und bestimmt seine Menge nach der üblichen Methodik.

3. Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe mit kondensierten Kernen und verwandte Substanzen.

A. Die Reinigung sowie die Scheidung von Vertretern dieser Körperklasse, welche dem Steinkohlenteer entstammt, sei auf Grund der Angaben von WINTERSTEIN und SCHÖN (2, 3), von WINTERSTEIN, SCHÖN und VETTER, von WINTERSTEIN und VETTER sowie von WINTERSTEIN, SCHÖN und VETTER beschrieben. Betreffend Zusammenhang zwischen Adsorptionsaffinität und Struktur sowie Konstitutionsformeln vgl. S. 29—33. Zunächst sieht man aus dem nachfolgenden Versuchsmaterial, daß selbst reinste Handelsprodukte im Quarzlicht-chromatogramm Begleiter verraten können.

Reinigung des Anthracens. a) 6 g Anthracen Riedel „für wissenschaftliche Zwecke" wurden aus Benzin an eine aktive Aluminiumoxyd-Säule (25 × 6 cm) adsorbiert. Beim Entwickeln

mit Benzin bildeten sich im obersten Bezirk einige schmutzigbraune Zonen, die keine Krystalle liefern. Im Quarzlicht sah man weiter unten einen schmalen, hellblau fluoreszierenden, tiefer einen gelben und unten einen blau fluoreszierenden, breiten Bezirk. Bei längerem Waschen ging das Anthracen größtenteils ins Filtrat, dessen erste Anteile paraffinähnliche Substanzen enthielten. Beim Einengen krystallisiert das Anthracen. Die oberste Zone wurde mit Äther eluiert, der Trockenrückstand des letzteren im Vakuum (0,5 mm) bei 150—170° sublimiert und die Substanz aus Benzol unter Zusatz von Benzin umgeschieden. Farblose Blättchen: 350 mg *Carbazol* = 5,8% des Ausgangsmaterials.



Carbazol.

Das erhaltene Anthracen zeigt intensiv blaue Fluorescenz, die schon durch einen Zusatz von $^1/_{30000}$% Naphtacen gelöscht wird.

b) 10 g Anthracen „Kahlbaum" wurden, wie beschrieben, adsorbiert. Beim Entwickeln gingen 6 g in das Filtrat. Der Rohrinhalt wurde mit Benzin + Methanol eluiert, das Methanol weggewaschen und die getrocknete Benzinlösung nochmals auf Al_2O_3 gegossen. Beim Entwickeln passierten 3 g reines Anthracen die Säule. Der wie angegeben eluierte und verarbeitete Rohrinhalt wurde nochmals adsorbiert (Säule 8 × 4 cm). Nach dem Entwickeln mit viel Benzin zeigt die Quarzlampe im obersten Teil zwei äußerst schmale, hellgelbe Zonen an (unbekannt), darunter einen hellblau fluoreszierenden Bezirk, aus welchem, nach der Elution mit Äther, schwach-gelbe Krystalle gewonnen wurden. Sublimieren im Vakuum und Umkrystallisieren aus Benzol lieferten 5 mg (0,05%) reines *Carbazol* (glänzende, hellblau fluoreszierende Blättchen). Dicht unter dem Carbazol befand sich eine schmale, gelb aufleuchtende *Naphtacen*-Scheibe und darunter eine dunkelblau fluoreszierende, aus der sich etwas *Anthrachinon* isolieren ließ.

Über die Gewinnung des *Naphtacens* aus einer technischen Anthracenöl-Fraktion vgl. das Original. — Trennung von Anthracen und Phenanthren: ARDASCHEW.

Reinigung des Chrysens (Formel auf S. 29), *Isolierung von 1,2-Benzcarbazol.* 5 g reinstes Handelsprodukt, in 600 cm³ Benzin + Benzol (10 : 1) gelöst, wurden an Al_2O_3 (14 × 4,5 cm) adsorbiert. Beim Entwickeln mit 500 cm³ Benzin entsteht oben eine

1 cm breite, hellblau fluoreszierende Zone, darunter eine schmale, die gelb aufleuchtet, während die unterste Scheibe sowie das Filtrat stark blau fluoreszieren. Die oberste Zone wird mit Äther eluiert; krystallisiert man dessen Abdampfrückstand aus Hexan und Eisessig um, so erscheint *1,2-Benzcarbazol* (Ausbeute 15 mg = = 0,3%). Die zweite Zone enthält *Naphtacen*, die unterste liefert vollkommen farbloses Chrysen, welches trotz scheinbarer Homogenität Spuren von Schwefel enthält. Bei der Wiederholung der Chromatographie hat sich die *Schwefelverbindung* in den ersten 75% des Filtrates angereichert und nur die letzte Fraktion (0,5 g) war vollständig S-frei. Man bemerkt die außerordentliche Ähnlichkeit der Adsorptionsaffinitäten von Chrysen und des schwefelhaltigen Körpers.

Auf prinzipiell ähnlichem Wege wurde aus *Pyren* „rein" 0,1% *Brasan* isoliert (2,3,5,6-Dibenzo-cumaron), das von Naphtacen und 2,3-(1',2'-Naphto)-anthracen begleitet wird (Formeln auf

O

Brasan.

NH

1,2-Benzcarbazol.

S. 29). Es empfiehlt sich hier, über die Al_2O_3-Schicht eine schmale Lage eines Aluminiumoxyd-Carboraffin-Gemisches zu geben, das Verunreinigungen besser zurückhält.

Die chromatographische Reinigung von Roh-*Picen* nimmt einen komplizierten Verlauf und führt zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis.

Aus käuflichem *Acridin* werden nach Wagner-Jauregg, beim Filtrieren der Benzollösung durch Al_2O_3, Verunreinigungen entfernt und in der Säule zurückgehalten, welche das Acridin passiert. Das Rohprodukt fluoreszierte fahlblau, die reine Substanz gelb.

Während das Vorstehende sich auf Handelsprodukte bezieht, folgen nun (nach Winterstein und Mitarbeitern) einige Beispiele, aus welchen die Leistungsfähigkeit des befolgten Verfahrens bei der Aufteilung von *künstlichen Gemischen* hervorgehen soll.

Trennung von Naphtalin und Anthracen. Eine petrolätherische

Lösung (200 cm^3) von 50 mg Anthracen + 150 mg Naphtalin wurde an 150 g aktiviertes Aluminiumoxyd adsorbiert und mit 500 cm^3 Petroläther entwickelt. Das Anthracen befindet sich in der oberen Säulenhälfte und wird mit Äther eluiert, der beim Verdampfen den reinen Kohlenwasserstoff hinterläßt. Der Trockenrückstand des Filtrates besteht aus reinem Naphtalin.

Trennung von Anthracen und Chrysen (Formel auf S. 29). Eine Benzinlösung, je 50 mg enthaltend, wurde, wie beschrieben, adsorbiert und mit Benzin so lange entwickelt, bis ein Teil der Substanz in das Filtrat übergegangen war. Im Rohre bildeten sich zwei Zonen aus, von welchen die obere (bei Quarzlicht-bestrahlung dunkelblau leuchtend) fast reines Chrysen enthielt. In den ersten Anteilen des Filtrates lag reines Anthracen vor.

Die Scheidung von *Anthracen* und *Pyren* gelang nicht.

Trennung von Phenanthren und Pyren (Formel auf S. 29). Verfährt man wie beschrieben und fängt das Filtrat in vier Anteilen auf, so enthält die letzte Portion fast reines Pyren.

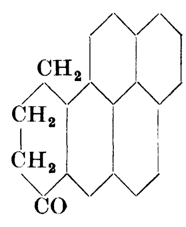
Die *Trennung des Chrysens von Pyren* (Formeln: S. 29) oder von 1,2-*Benzpyren* gelang auf ähnlichem Wege.

Trennung von Perylen und 1,2-Benzpyren (Formeln: S. 32). Nach der Entwicklung beobachtet man im Uviollicht ein breites, gelb leuchtendes Band, darunter eine hellblau fluoreszierende Zone ($^1/_5$ der ersteren). Der Rohrinhalt wurde in fünf Teile geteilt: der unterste liefert reines 1,2-Benzpyren; die übrigen gaben Gemische, und zwar überwog Perylen in den oberen, Benzpyren in den tieferliegenden Bezirken.

Im Hinblick auf die von COOK, HEWETT und HIEGER entdeckte, von SCHÜRCH und WINTERSTEIN näher studierte *krebserregende Wirkung* des *1,2-Benzpyrens* (wird auch „3,4-Benzpyren" genannt) soll hier die künstliche Darstellung dieses Kohlenwasserstoffes (Formel: S. 32) beschrieben werden, da die chromatographisch gelungene Reinigung für das Studium maligner Tumoren von Wichtigkeit ist.

50 g 4′-Keto-1′,2′,3′,4′-tetrahydro-1,2-benzpyren (dargestellt, ebenfalls unter Zuhilfenahme der Chromatographie, von WINTERSTEIN, VETTER und SCHÖN) + 30 g Selen wurden 12 Stunden auf 320—340° erhitzt. Man gießt die flüssige Masse in eine große Reibschale, pulverisiert sie nach dem Erkalten fein und kocht das

Material mit 1 l Benzol aus. Der bis zu 500 cm³ eingeengte Extrakt wird in einer 15 cm hohen Al_2O_3-Schicht adsorbiert, auf welche man eine 5-cm-Lage von Aluminiumoxyd + Carboraffin (2 : 1) gibt. Entwicklung mit Benzin + Benzol (5 : 1). Das 1,2-Benzpyren ging rasch in das Filtrat über. Es wurde so lange nachgewaschen, bis aus der Kohleschicht eine grüne und eine braune Zone ausgetreten waren. Beim Einengen des Filtrates auf ein kleines Volumen und Zusatz von Petroläther fiel reines 1,2-Benzpyren aus. Gelbgrüne Nädelchen, Schmelzp. 177° (korr.). Ausbeute 22 g = 47% der Theorie.



4′-Keto-1′,2′,3′,4′-tetrahydro-1,2-benzpyren.

B. Im Anschluß an das soeben gegebene Versuchsmaterial, das sich vorwiegend auf Teerbestandteile bezieht, folgen nun zwei Beispiele über die Chromatographie von Substanzen, welche durch *Dehydrierung von Naturstoffen* erhältlich sind.

a) *Reinigung eines aus Cholesterin gewonnenen Kohlenwasserstoffes* $C_{18}H_{16}$ (γ-Methyl-cyclopenteno-phenanthren) nach DIELS und RICKERT. Das aus Cholesteryl-chlorid mit Hilfe von Selen dargestellte, aus Alkohol prächtig krystallisierende Produkt erwies sich, trotz des schönen Aussehens, in der Aluminiumoxyd-Säule als uneinheitlich und ließ sowohl feste als auch ölige Beimengungen entfernen. Merkwürdigerweise wurde hierdurch der Schmelzpunkt nicht fühlbar abgeändert.

Als Apparat diente die Vorrichtung von WINTERSTEIN und STEIN (1; S. 51), mit einem am Vorstoß angebrachten Sperrhahn, als Lösungs- und Waschmittel Petroläther (Siedep. 70—80°). Etwa 3 g vorgereinigte Substanz, gelöst in 95 cm³ (bei 15—20°), wurden unter schwachem Saugen langsam auf die durch Einschlämmen mit Petroläther bereitete Säule getropft (20 × 2 cm). Ein gelber, ölhaltiger Ring wanderte langsam nach unten und war am Ende des Versuches 8—10 cm tief vorgedrungen. Nach dem Austreten der Lösung aus dem Tropftrichter wird mit 3—4 cm³ mehr Petroläther, als bei Raumtemperatur zum Auflösen des Ausgangspräparates erforderlich sind, entwickelt. Man sperrt dann den Hahn und wechselt rasch die Saugflasche.

Sobald die Lösung des Kohlenwasserstoffes in die Vorlage zu tropfen beginnt (Schlierenbildung und blaue Fluorescenz des

Filtrates im Quarzlicht!), fängt man 10 Tropfen gesondert auf und erneuert wieder die Vorlage, in die nun das Hauptprodukt fließt. Der Versuch ist beendet, sobald die Entwicklungsflüssigkeit aus dem Tropftrichter ausgetreten ist und bei gleichgehaltenem Vakuum nichts mehr in die Vorlage gelangt. Durch Eindampfen der stark fluoreszierenden Lösung auf dem Wasserbade (schließlich im Vakuum) und Wiederholen der Adsorptionsanalyse in einem kleineren Maßstab (wobei nur mehr wenig Gelbes haften blieb und höchstens 2 cm nach unten wanderte), wird 1,9 g γ-Methyl-cyclopenteno-phenanthren gewonnen. Weiße, hellblau fluoreszierende Blättchen, Schmelzp. 124—125°.

CH_3 — CH — CH_2 — CH_2

γ-Methyl-cyclopenteno-phenanthren.

Nach Beendigung des Reinigungsverfahrens zeigt die Quarzlampe an der Stelle des ölhaltigen gelben Ringes stark hellgrüne Fluorescenz und, von diesem Bezirk abwärts, das bis zum unteren Rohrende sich verstärkende blaue Leuchten des Hauptproduktes. Auf Grund dieser Beobachtung ließen sich zwei krystallisierte Begleiter (Kohlenwasserstoffe) gewinnen.

b) Bei der Selen-dehydrierung der *Chinovasäure* (Aglykon des Chinarinden-bitterstoffes Chinovin) und besonders der *Brenzchinovasäure* haben Wieland, Hartmann und Dietrich die vollkommene Reinigung der gebildeten Kohlenwasserstoffe C_nH_n und $C_{25}H_{20}$ nur auf chromatographischem Wege erreichen können, nämlich durch Filtrieren der Benzollösung (150 mg in 25 cm³) durch aktiviertes Aluminiumoxyd (15 × 1 cm). Der übergegangene Kohlenwasserstoff $C_{25}H_{20}$ wurde dann nach folgender Vorschrift in ein *Chinon* verwandelt. Die Suspension von 0,25 g in 50 cm³ stabilem Eisessig wird mit 0,2 g CrO_3 3 Stunden am Rückfluß gekocht. Von geringfügigen ungelösten Resten saugt man heiß ab und fällt das Oxydationsprodukt mit Wasser. Nach zweimaligem Zentrifugieren wird das ziegelrote Chinon genutscht, gründlich gewaschen und auf Ton getrocknet. Krystallisier-ansätze verliefen zunächst negativ, erst die Reinigung durch Adsorption brachte einen Erfolg:

200 mg Rohchinon in 120 cm³ Benzol lieferten bei der Aufteilung auf aktivem Al_2O_3 (15 cm hoch) ein farbloses Filtrat, welches alsbald unveränderten Kohlenwasserstoff abschied; aus

der Entwicklungsflüssigkeit (150—200 cm³ Benzol) gewinnt man noch etwas davon (Schmelzp. 295⁰). In der Säule blieb eine 4 cm hohe, rote *Chinon*-Schicht hängen. Sie wurde mit Benzol extrahiert, aus welchem beim längeren Stehen harte, glänzende, rote Blättchen hervorschossen. Man krystallisiert sie aus Benzol und dann aus Pyridin um. Schmelzp. 252—255⁰ (unscharf, Zersetzung).

4. Pflanzliche und tierische Gifte mit sterinartigem Gerüst.

Pflanzliche Herzgifte.

Jüngst haben TSCHESCHE und BOHLE aus käuflichen *Strophanthus*-Samen (wahrscheinlich *S. Preussii* und *S. Barteri*) den in Chloroform löslichen Anteil der herzwirksamen Glucoside mit Hilfe der Adsorptionsmethodik zum Krystallisieren gebracht. Das Präparat erwies sich mit dem *Sarmentocymarin* $C_{30}H_{46}O_8$ von JACOBS und HEIDELBERGER als identisch.

5 kg gemahlene Samen wurden im Soxhlet mit Petroläther entfettet, an der Luft getrocknet und mit Methanol ausgezogen. Man dampft am Wasserbade ab, nimmt mit Wasser auf, äthert die Lösung aus und schüttelt die wäßrige Schicht 10mal mit je 300 cm³ Chloroform. Der Abdampfrückstand des Chloroforms (hellbraunes Öl 17 g) wird im Exsiccator getrocknet und in 170 cm³ Chloroform gelöst. Man fügt 1 Vol. Benzol zu und gießt die Flüssigkeit auf Al_2O_3 (nach BROCKMANN). Die Säule ist so lange mit Chloroform + Benzol (1:1) nachzuwaschen, bis das Filtrat farblos abläuft. Nun wird das letztere verdampft und sein Rückstand mit Methanol aufgenommen. Die über Nacht ausgeschiedenen Krystalle lassen sich aus Methanol, hierauf aus wäßrigem Aethylalkohol umscheiden und schmelzen dann bei 136—137⁰.

Das aus *Sarmentogenin* $C_{23}H_{34}O_5$, einem weiteren Genin des Strophanthus von TSCHESCHE und BOHLE bereitete *gesättigte Lacton* erwies sich als identisch mit dem bekannten Lacton aus *Digitoxigenin* $C_{23}H_{36}O_2$. Der Schmelzpunkt des letzteren wird durch fraktionierte Adsorption an Aluminiumoxyd bis zu 188—189⁰ erhöht.

Krötengift.

Die Isolierung des *Hauptgiftes der einheimischen Kröte* (*Bufo vulgaris*), des *Bufotalins* $C_{26}H_{36}O_6$, konnte von WIELAND, HESSE und HÜTTEL auf chromatographischem Wege einfacher und mit weit besserem Ertrag erreicht werden als nach älteren Verfahren.

```
                                        ,CH ---=CH
              CH3                    C<        |
              |                      | \CH—O—C=O
              CO      CH2   CH3 CH
              |      /   \  |  /   \
              O   CH2      C       CH2
               \  |        |       |
   CH2  CH3  C        C .......CH2
  /    \ | /    \     / |
CH2      C       CH      OH
|        |       |
CHOH     CH      CH2
  \     /  \    /
   CH2       CH2
```

Bufotalin (wahrscheinliche Formel).

Das Gift von rund 33000 Tieren wurde durch Ausdrücken der Parotiden mit Pinzetten gewonnen und das in Watte aufgesaugte Sekret (netto 439 g), nach dem Trocknen über P_2O_5, in drei Anteilen verarbeitet. Man hat das Material im Soxhlet innerhalb 4—5 Tagen mit alkoholfreiem Chloroform erschöpft, die Extrakte im Vakuum stark eingeengt und durch Schütteln mit n-Soda entsäuert (meist Fällung). Nun wird die Chloroformlösung (samt entstandenem Niederschlag) in viel Petroläther eingerührt und die krümelige, gut getrocknete Fällung aus Aceton, auf Aluminiumoxyd (nach BROCKMANN) chromatographiert. Schon eine einzige Adsorption führt zu der fast quantitativen Trennung von Bufotalin und von Nebengiften, während eine weitere Aufteilung der letzteren auf diesem Wege nicht möglich war. Beispiel:

Die mit Petroläther wie beschrieben erzielte trockene Fällung wog 35 g; sie wurde in 10 Teilen Aceton gelöst, filtriert und auf die Säule gegossen (16 × 7 cm). Ein natürlicher gelber Farbstoff, der ebenso festgehalten wird wie das Bufotalin, diente als Adsorptions-indicator. Man entwickelt so lange mit Chloroform, bis fast das gesamte gelbe Pigment durchgewaschen ist und zerteilt dann die Säule auf Grund ihres Aussehens, der Uviollicht-Fluorescenz sowie der LIEBERMANN-Reaktion (links Dicken in Millimeter):

10 I. Zone, braun, fluoresziert blau, Farbreaktion schwach (verworfen).
90 II. Zone, farblos, fluoresziert grün, LIEBERMANN-Reaktion rosa-blau-blaugrün.
40 III. Zone, enthielt das obere Ende des fast ganz durchgewaschenen gelben Farbstoffes. Keine Fluorescenz. LIEBERMANN-Reaktion derjenigen des Bufotalins sehr ähnlich.
20 IV. LIEBERMANN-Reaktion des reinen Bufotalins: rot-violett-blau-grün.

Aus der II. Zone wurden, nach der Elution mit warmem Chloroform + Methanol (1 : 1), 3,2 g Nebengiftgemisch auskrystallisiert (Schmelzp. 210°); auch III. enthält im wesentlichen noch Nebengifte (2,2 g), während die IV. Zone 3,2 g Bufotalin liefert (Schmelzpunkt 147°). Aus dem gelben Filtrat wurde die größte Menge des krystallinischen Hauptgiftes isoliert, nämlich 5,4 g Bufotalin vom Schmelzp. (148°) 222° und 0,6 g, Schmelzp. 146°.

Aus der ganzen Sekretmenge ließen sich in einem Arbeitsgang 27,4 g Bufotalin und 15,3 g Nebengiftgemisch fassen.

Zur raschen *Reinigung* von Bufotalin-Präparaten ist ebenfalls die Chromatographie geeignet: Bufotalin (Schmelzp. 145°) kann durch einmalige Adsorption aus Aceton und Nachentwickeln mit Chloroform in ein Präparat mit dem Schmelzp. (148°) 222° übergeführt werden; Ausbeuten: 85% reine Substanz und 10% Nebengifte.

Die nicht mehr krystallisierenden Mutterlaugen der Genine wurden vereinigt und eintrocknen gelassen, worauf man die zähe Schmiere mit Chloroform aufnimmt, mit Sodalösung und Wasser schüttelt, mit viel Petroläther fällt und den Niederschlag wie oben chromatographiert. Roherträge: 8,1 g Bufotalin und 13,5 g Nebengiftgemisch. Die beschriebenen Operationen können noch öfters wiederholt werden, allerdings sinken die Ausbeuten rasch. (Eine Behandlung mit Petroläther ist unnötig.)

Auch die Gewinnung des *Cinobufagins* $C_{25}H_{32}O_6$ aus einer chinesischen Droge („Ch'an Su"), welche aus dem Parotissekret der chinesischen Kröte (*Bufo gargarizans*) erzeugt wird, gelingt nach TSCHESCHE und OFFE (1, 2) am besten chromatographisch.

Man extrahiert das Material im Soxhlet-Apparat mit Chloroform, bis das Lösungsmittel farblos abläuft, dampft den Extrakt auf dem Wasserbad bis zu einem dicken Öl ein und versetzt das letztere mit Benzol, solange kein Niederschlag entsteht. Gießt man nun die Lösung auf eine Aluminiumoxyd-Säule (nach BROCK-

MANN), so zeigen sich 3—4 gelbe Scheiben im oberen Viertel der Füllmasse, welche langsam nach unten wandern. In der Gegend des ersten Ringes befand sich der Hauptanteil des Bufagins. Man arbeitet mit derselben Säule weiter, bis eine dunkle Zone fast das untere Ende des Rohres erreicht hatte, dampft dann das goldgelbe Filtrat zur Trockne, rührt den Rest mit wenig Essigester an, reibt oder impft. Die erhaltenen Krystalle werden wiederholt aus Alkohol umgelöst. Endertrag 15 g Cinobufagin, aus 2,5 kg Droge, Schmelzp. 223°. Man kann den letzterwähnten Trockenrückstand auch direkt acetylieren.

Reinigung der Desacetyl-hexahydro-cinobufagonsäure: TSCHESCHE und OFFE (2).

Angaben über Adsorptions- und Elutionsverhältnisse eines *Schlangengiftes*: TSUCHIYA.

5. Alkaloide.

Auf diesem Gebiete eröffnen sich mannigfache Verwendungsmöglichkeiten für das TSWETTsche Verfahren, welche noch bei weitem nicht ausgenutzt sind. Man wird in zahlreichen Fällen entweder die Alkaloidsalze in wasserhaltigem bzw. wäßrigem Medium untersuchen können oder aber die Basen selbst, in wasserfreien Lösungsmitteln. Für den letzteren Fall ist die Füllung des Rohres mit einem sauren Adsorbens naheliegend, jedoch nicht unbedingt erforderlich.

Chinin und Cinchonin.

KARRER und NIELSEN ist die Trennung von *Chinin* und *Cinchonin* in einer Floridin-XXF-Säule gelungen. Man löst je 100 mg Base in Chloroform + Benzol (1 : 1) und chromatographiert in einer Uviolglasröhre, wobei mit Chloroform + Benzol (jetzt 4 : 1) entwickelt wird. Im Lichte der Quarzlampe sah man drei Schichten fluoreszieren: oben: hell-lila, dann: silberglänzend, unten: braun. Die oberste Zone gab an siedenden Alkohol eine Substanz ab, die bei 208° schmolz, die mittlere eine solche mit dem Schmelzp. 50°, der unterste, dunklere Bezirk gar nichts. Die erstere Fraktion zerfiel bei erneuerter Chromatographie in drei Scheiben, von welchen die oberste reines Cinchonin (Schmelzp. 254°) liefert, während das zweite Präparat ein Chromatogramm ergab, aus dessen mittlerem Anteil reines Chinin gewonnen wurde (Schmelzp.: wasserhältig 56°, wasserfrei 177°).

Mutterkornalkaloide.

Es bedeutet einen großen Fortschritt, daß es der *Chemischen Fabrik vorm. Sandoz* gelungen ist, die Trennung, Zerlegung und Reindarstellung von sehr empfindlichen Alkaloiden des Mutterkorns (*Claviceps purpurea*) durchzuführen. Es handelt sich hier um *Ergotamin* $C_{33}H_{35}O_5N_5$, *Ergotaminin* $C_{33}H_{35}O_5N_5$, ferner um *Ergotinin* $C_{35}H_{39}O_5N_5$ und sein Isomeres *Ergotoxin* $C_{35}H_{39}O_5N_5$.

Von der Adsorptionssäule werden nicht etwa die schwerer löslichen, physiologisch wenig wirksamen Alkaloide *Ergotaminin* bzw. *Ergotinin* zurückgehalten, sondern die viel leichter löslichen Träger der Mutterkornwirkung, nämlich *Ergotamin* und *Ergotoxin*. Ferner gelang nicht nur die Zerlegung von ballastfreien Ergotamin + Ergotaminin- und von Ergotoxin + Ergotinin-Gemischen sowie die Isolierung der Ergotoxin-Base in krystallisierter Form, sondern auch die Verarbeitung von Rohextrakten. Endlich erwiesen sich die früher bekannten Präparate „Sensibamin“ und „Ergoclavin“ (Brit. P. 388529, DRP. 606778) in der TSWETTschen Säule als uneinheitlich.

Reindarstellung von Ergotamin aus einem Rohextrakt. 100 cm^3 eines ergotaminhaltigen Rohauszuges (Benzol) wurden durch die mit Benzol angefeuchtete Milchzuckersäule (120 g) geschickt. Beim Nachwaschen mit Benzol läuft zuerst eine alkaloidfreie, ölhaltige Lösung ab, dann eine solche mit Spuren von rechtsdrehendem Ergotaminin, schließlich die Hauptfraktion, linksdrehendes *Ergotamin* von hohem Reinheitsgrad enthaltend. Man dampft bei tiefer Temperatur im Vakuum ein, nimmt mit wasserhaltigem Aceton auf und erhält fast wasserhelle, rhombische Prismen und Tafeln.

Krystallisiertes Ergotoxin aus dem Gesamtalkaloid. 1 g in 50 cm^3 Chloroform wird durch Al_2O_3 (nach BROCKMANN) geschickt. Beim Entwickeln der Schichten und Ausziehen gehen zuerst alkaloidfreie Substanzen ab, dann eine rechtsdrehende Alkaloidlösung, aus welcher, je nach Herkunft und Verarbeitung der Droge, mehr oder weniger Ergotinin-Krystalle isoliert werden können. Später durchlaufende Anteile drehen nach links und gaben beim sorgfältigen Abdampfen (Raumtemperatur) einen Rückstand, der aus Benzol sofort krystallisierte und sich als reine *Ergotoxin-Base* erwies.

Trennung eines Gemisches von Ergotamin und Ergotaminin. 120 g Aluminiumoxyd (nach BROCKMANN) werden in einem Rohr (40 × 2,2 cm) mit reinem Chloroform durchtränkt und dann je 0,5 g der beiden Alkaloide in 100 cm³ Chloroform eingeführt. Man entwickelt mit demselben Solvent und erkennt eine Schichtung unter der Quarzlampe. Eine schmalere, stark alkaloidhaltige Zone läuft zuerst ab, dann folgt eine alkaloidarme Fraktion, während der obere Bezirk der Kolonne lebhaft violettweiß fluoresziert. Die ersten Filtratanteile (50 cm³) drehen nach rechts ($\alpha_D = + 8{,}38^0$, im 2-dm-Rohr), bei den weiteren 200 cm³ geht die Rechtsdrehung ständig zurück und es folgt (nach sehr alkaloidarmen Zwischenfraktionen) die linksdrehende Lösung des Ergotamins. Die rechtsdrehenden Anteile werden im Vakuum eingedampft (0,52 g); durch einmaliges Umkrystallisieren aus Pyridin erhält man reines *Ergotaminin* in hoher Ausbeute. Die linksdrehenden Extrakte gaben 0,33 g reines *Ergotamin*, das aus wasserhaltigem Aceton auskrystallisiert.

Trennung eines Gemisches von Ergotoxin und Ergotinin. Je 0,5 g amorphe Ergotoxin-Base und krystallisiertes Ergotinin werden, wie soeben beschrieben, verarbeitet. Beim Entwickeln und Ausziehen der Adsorptionsschichten erhält man auch hier zuerst rechtsdrehende Fraktionen, die wohlkrystallisiertes Ergotinin liefern. Der Trockenrückstand der linksdrehenden Anteile wird in möglichst wenig Benzol gelöst; beim Stehen erscheint krystallisierte Ergotoxin-Base in guter Ausbeute, trotzdem die Ausgangssubstanz amorph war.

Die Aufteilung des „Sensibamins“ (1 g in 100 cm³ Chloroform) gelang auf ähnlichem Wege. Nach dem Entwickeln und Ausziehen tropft zuerst eine rechtsdrehende Flüssigkeit ab (sie liefert *Ergotaminin*-Krystalle aus Pyridin), dann folgt die Lösung des linksdrehenden *Ergotamins* (isolierbar aus wäßrigem Aceton). Das *„Ergoclavin“* kann ebenso aufgeteilt werden, wenn nötig, unter Wiederholung des Adsorptionsversuches.

6. Enzyme, Co-enzyme, biochemische Aktivatoren.

Die Methode ist auch auf diesem Gebiete noch weitaus ungenügend verwertet worden. Daß aber die Aussichten nicht schlecht sind, geht aus den Enzymforschungen von WILLSTÄTTER hervor, in welchen Adsorptionen und Elutionen bekanntlich die

entscheidende Rolle gespielt haben. Es handelt sich also nur darum, die besonderen Vorteile auszunützen, welche von der TSWETTschen Arbeitstechnik geboten werden. Tastversuche der Literatur deuten hier auf einen baldigen Fortschritt.

ADLER und MICHAELIS ist zwar die Trennung von Dehydrase und Flavinenzym auf Aluminiumoxyd nicht gelungen, da die beiden Komponenten sich diffus über die Säule verteilten, immerhin fand im unteren Bezirk des Adsorbens eine Verarmung an Flavin und Anreicherung der Dehydrase statt.

Trennung von Co-Zymase und Co-Dehydrase II nach Euler und Adler. Die genannten Autoren fanden in der Hefe zwei Co-Dehydrasen vor, nämlich:

Co-Zymase: notwendige Komponente des Systems der Alkoholdehydrase aus Hefe, aber im System der Robisonester-Dehydrierung unwirksam;

Co-Dehydrase II: umgekehrtes Verhalten.

In wäßriger Lösung, auf Aluminiumoxyd (nach BROCKMANN) chromatographiert, läßt sich die Co-Dehydrase II im obersten Teil der Säule festhalten, während die Co-Zymase beim Entwickeln in das Filtrat gelangt. Zur Untersuchung der einzelnen Säulenteile mußte hier empirisch verfahren werden: man prüfte die Teileluate in den Systemen der Robisonester-Dehydrierung sowie der Alkoholdehydrierung und der alkoholischen Gärung. Die Ultra-chromatographie versagt, da Begleiter fluoreszieren.

100 mg eines mittelguten Präparates (erhalten aus der Cuprofällungs-Mutterlauge einer Co-Zymasedarstellung) wurden in 10 cm³ Wasser gelöst, filtriert und in der Al_2O_3-Säule (8 × 0,7 cm; durch Aufschütten einer wäßrigen Suspension bereitet) zerteilt. Unter schwachem Saugen wurde zuerst mit 15 cm³ Wasser nachgewaschen und das erste Filtrat (21 cm³) gesondert aufgefangen, worauf man weitere 100 cm³ Wasser nachgoß („Waschwasser" 94 cm³). Versuchsdauer 2 Stunden. Der obere (fluoreszierende) Säulenteil wurde in kleinere, der übrige in größere Stücke zerschnitten, die im Vakuum getrocknet und gewogen wurden. Man prüft die Adsorbate nach der Gärungsmethode auf ihren Co-Zymasegehalt und ferner wird ihre Wirksamkeit in den Systemen der Alkohol- sowie der Robisonester-Dehydrase untersucht (THUNBERG-Versuch). Ergebnis: von den 2260 Co-Zymase-Einheiten befanden sich 1980 im Waschwasser, während von den 452

Co-Dehydrase-II-Einheiten die drei obersten Bezirke des Adsorbens 294, 140 bzw. 18 enthielten; die übrigen Zonen sowie Filtrat und Waschwasser waren davon frei. Es hat also eine gute Trennung stattgefunden.

Neue Versuche werden von EULER und SCHLENK angekündigt.

Die *Co-Dehydrase II* ließ sich auch in der Rinder*leber* nachweisen (DAS). 10 cm³ einer Lösung von HARRISONschem Co-Fermentpräparat (entspr. 50 g Aceton-Trockenleber) wurden auf Al_2O_3 (nach BROCKMANN, 5 × 0,7 cm) gegossen. Nachwaschen mit 50 cm³ Wasser, Zerschneiden in 5 Teile. Die drei obersten Schichten enthielten Co-Dehydrase II, sie waren aber frei von Co-Zymase. Prüfung wie oben angeführt.

7. Vitamine.

Vitamin A.

Reindarstellung. Dieser lipoidlösliche Wachstumsfaktor, der sich im Tierkörper, bekanntlich aus dem Carotingehalt der pflanzlichen Nahrung bildet, wird reichlich von Lebern gewisser Fische dargeboten.

Aus den Leberölen von *Hippoglossus hippoglossus* (Heilbutt) bzw. von *Scombresox saurus* (Makrelenhecht) haben KARRER, MORF und SCHÖPP einen Auszug mit tiefsiedendem Petroläther bereitet, der mittels 12proz. alkoholischem Kali, bei 60°, unter Stickstoff, innerhalb 1 Stunde verseift wurde. Der mit Petroläther extrahierte, unverseifbare Anteil enthält bedeutende Sterinmengen und wird beim Verdampfen des Lösungsmittels nahezu fest. Durch Auflösen in heißem Methanol und mehrstündiges Aufbewahren bei —15° krystallisierten die Sterine fast vollständig aus. Sie wurden bei —15° abgesaugt; aus dem Filtrat konnte nach längerem Stehen im Kälteraum noch etwas Sterin entfernt werden. Eine weitere Reinigung wird durch Ausfrieren von Flocken aus Methanol, in Kohlendioxyd-Aceton-Mischung erzielt. Das Vitamin bleibt dabei in Lösung. Nun verdünnt man die Flüssigkeit mit Wasser und erschöpft sie mit leichtem Petroläther.

Schon die beschriebenen Operationen bedingen eine weitgehende Anreicherung von Vitamin, dessen Reindarstellung jedoch erst im Wege der *Chromatographie* gelingt:

Die Petrolätherlösung wurde durch eine Säule von Fasertonerde (Merck) gesaugt, wobei das Vitamin in einer mittleren Schicht hängen blieb (darüber: Spur Sterin, tief unten: niedriger molekulare Begleiter). Man eluiert die Hauptzone zweckmäßig mit Methanol, führt den Stoffinhalt in Petroläther über und wiederholt die Adsorptionsanalyse noch zweimal. Der Petroläther läßt schließlich ein außerordentlich reines Vitamin-A-Präparat $C_{20}H_{30}O$ zurück, dessen CLO-Zahl bis zu 10500 reicht. Die letztere Konstante ließ sich durch weitere Adsorptionen oder durch Acetylieren und Regenerieren nicht mehr erhöhen.

Erst die Chromatographie verhalf also zu analysenreinen Produkten und sie führte auch zur Aufstellung der folgenden Strukturformel:

```
CH3 CH3
  \ /
   C
  / \
CH2  C—CH=CH—C=CH—CH=CH—C=CH—CH2OH
|    ||      |           |
CH2  C—CH3   CH3         CH3
  \ /
  CH2
```

Vitamin A (nach Karrer, Morf und Schöpp).

Während die Leistungsfähigkeit der Tonerde-Säule mit den obigen Ergebnissen erschöpft war, konnten Karrer und Morf (s. auch Karrer, Walker, Schöpp und Morf) noch einen Schritt weiter vordringen, als sie das Al_2O_3 durch eine Calciumhydroxyd-Säule ersetzten. Nun zerfiel ihr bestes Präparat in zwei ungleiche Schichten:

Oben: β-Fraktion des A-Vitamins (Hauptanteil): zeigt scharf die Zusammensetzung $C_{20}H_{30}O$ und das charakteristische Lichtabsorptionsmaximum bei 325—328 $\mu\mu$; $\varepsilon_{325\mu\mu}$ = ca. 1700 (1proz. Lösung). Sie löst sich in Antimontrichlorid-Chloroform mit tiefblauer Farbe (opt. Schwerpunkt 622 $\mu\mu$).

unten: α-Fraktion (nur einige Prozente, vielleicht ein Oxydationsprodukt); enthält weniger Kohlenstoff, zeigt ein Maximum gegen 270 $\mu\mu$ und gibt mit dem Carr-Price-Reagens eine violette Lösung (580 $\mu\mu$).

Durch Adsorptionen an Fullererde haben van Eekelen, Emmerie, Julius und Wolff schon früher eine Scheidung des Vitamins in zwei Anteile vorgenommen.

Es sei vermerkt, daß man nach HEILBRON, HESLOP, MORTON, WEBSTER, REA und DRUMMOND auch im Wege von Hochvakuumdestillationen zu reinen Vitamin-A-Präparaten gelangen kann, deren Kennzahlen mit Hilfe der TSWETTschen Methodik kaum mehr abgeändert werden.

Zu solchen Versuchen wurde die auf S. 52, Abb. 10 wiedergegebene Vorrichtung angewandt, welche mit einer 75 cm hohen Schicht von Fasertonerde gefüllt war. Vorher haben die Autoren das Adsorbens zwischen 150—200° in reinem Stickstoffstrom getrocknet, den Apparat gleichfalls mit N_2 gründlich durchspült, worauf eine Lösung von 2,5 g Vitamin A in 25 cm³ leichtem Petroläther langsam eingesickert wurde. Nach dem Entwickeln mit dem gleichen Solvent hat man das Glasrohr in drei Teile zerschnitten, die Fraktionen mit je 50 cm³ heißem Holzgeist eluiert und dessen Inhaltsstoff, nach dem Verdünnen mit je 200 cm³ Wasser, in Petroläther zurückgeführt.

Chromatographische Gewinnung von A-Präparaten aus dem Leberöl der *Theragra chalcogramma:* HAMANO.

Während die KARRERschen Versuche, wie erwähnt, zur Aufteilung der höchstkonzentrierten A-Präparate in zwei Komponenten geführt haben, ergab sich bei den Versuchen von CASTLE, GILLAM, HEILBRON und THOMPSON ein noch verwickelteres Bild. Die Lösung von 0,5 g Konzentrat in Benzin (Siedep. 60—80°) wurde in einer hohen Calciumhydroxyd-Säule (51 × 4 cm) chromatographiert und mit einigen Litern des genannten Solvents gewaschen. Alsbald erschien eine hellgelb-bräunliche Zone, die schließlich bis zur halben Höhe gesunken war, und dann aus zwei breiteren, schokoladebraunen Bezirken sowie aus einigen dünnen Strichen bestand (Abb. bei CASTLE u. Mit.). Insgesamt zeigte das Rohr fünf verschiedenartige Abschnitte:

Oben: Oxydationsprodukt des Vitamins (kaum gefärbt),
Hauptschicht: Vitamin A = β-Vitamin A von KARRER,
etwas rotes Material (s. oben), wahrscheinlich *während der Adsorption gebildet*, vielleicht Polymerisate enthaltend,
eine Schicht, dem KARRERschen α-Vitamin A entsprechend („Hepaxanthin", *vielleicht ein Zersetzungsprodukt*),
unten: gelbe Nebenzone, unbekannt (389, 369, 348 $\mu\mu$, in Alkohol).

Die Darstellung von hochgereinigten A-Präparaten nach dem Prinzip des „*flüssigen* Chromatogramms" gelang HOLMES, CASSIDY, MANLY und HARTZLER. Nachdem Cholesterin und andere Begleiter aus einer Pentanlösung des unverseifbaren Heilbutt-

leberöl-Anteiles ausgefroren wurden, haben die Autoren die Adsorption zuerst auf Norit A (aktiviert im N_2-Strom), sodann in der Magnesiumoxyd-Säule (zur Beschleunigung der Filtration mit 1 Teil Silicaerde „Hyflo Super Cel“ verdünnt) vorgenommen.

In den auf S. 52 erwähnten Apparat (Abb. 11), der ständig mit reinem Stickstoff gefüllt war, wurde eine dünne Suspension von Norit in Pentan eingeführt und Glasbläschen durch Klopfen daraus entfernt. Maße des Adsorbens 23 × 2,5 cm (40 g); aufgeteilt wurden je 6 g Konzentrat in 50 cm³ Pentan. Die Einzelfiltrate lagen zwischen 50 und 150 cm³. Durch entsprechendes Öffnen und Schließen der Sperrhähne wurde erreicht, daß die Luft auch während des Wechselns der Vorlage ausgeschlossen blieb; ferner wurden stets mit Stickstoff vorgefüllte Vorlagen angehängt. Das reine Endprodukt war in bezug auf den Blauwert 14000mal kräftiger als das Leberöl.

Trennung von Vitamin A und Carotinoiden.

Wie KARRER und SCHÖPP finden, gelingt diese Scheidung sowohl in Anwesenheit von Carotin als auch von Xanthophyll sehr glatt. Das Vitamin A wird nämlich zufolge seines Alkoholcharakters stärker adsorbiert als Carotin, jedoch viel schwächer als Xanthophylle, welche ein längeres Chromophor und 2 OH-Gruppen besitzen.

a) *Trennung von Vitamin A und Carotin.* Man saugt die Petrolätherlösung durch eine Fasertonerde-Säule und spült mit Petroläther nach. Die oberen Bezirke enthalten nur das Vitamin, darunter sieht man die Carotinzone, eventuell noch A-Spuren enthaltend, welche aber bei einer Wiederholung des Versuches sich leicht ausschalten lassen. Elution mit Petroläther + Methanol 9:1.

b) *Trennung von Vitamin A und Xanthophyll* (oder Zeaxanthin usw.). Man schickt die Lösung (Benzin oder Benzol + Benzin) durch Calciumcarbonat, wobei das Vitamin vollständig in das Filtrat gelangt. Ein Ansatz genügt.

Auf diesem Wege konnten GILLAM und HEILBRON das Vorkommen von Vitamin A im *Eidotter* beweisen. Die Ätherauszüge wurden verseift, von Sterinen befreit und zwischen Petroläther sowie 90—92proz. Methanol entmischt, worauf man die hypophasischen Stoffe mit Wasser in Benzin führt und nach b) aufteilt.

S. auch einige Angaben von HOLMES, DELFS und CASSIDY. Allgemeines über das Adsorptionsverhalten des Vitamins A im Vergleich zum Carotin, namentlich auf Blutkohle: BOWDEN und BASTOW.

Im Anschluß an das A-Vitamin sei noch die folgende Literaturstelle erwähnt: Nach EMMERIE läßt sich, durch energisches Verseifen der aus Lebertran erhaltenen Fettsäuren mit kochendem alkoholischem Kali, eine gelbe amorphe Substanz chromatographisch isolieren (akt. Al_2O_3, Benzin; Waschen mit Sprit, Elution mit verdünntem alkoholischem KOH), die mit dem CARR-PRICE-Reagens eine violette Farbreaktion gibt. Ausbeute: wenige Milligramme aus 15 g Fettsäuregemisch.

Das Vitamin B_2 (Lactoflavin)

wurde als Farbstoff bereits S. 134 besprochen (Flavine).

Vitamin D.

Das antirachitisch wirksame *Vitamin D_3* wurde als Bestrahlungsprodukt des 7-Dehydro-cholesterins von WINDAUS, SCHENCK und v. WERDER isoliert und gleichzeitig von BROCKMANN (3) aus dem Leberöl des Thunfisches herausgearbeitet. Im Verlaufe beider, so verschiedenen Arbeitswege verhalf die Chromatographie zum Erfolg, (s. auch NERACKER und REICHSTEIN).

```
                                    CH3
                                    |
                                    CH       CH2
                                   /         |
                    CH2   CH3 CH             CH2
                   /    \ | /     \          |
              CH2        C          CH2      CH2
              |          |          |        |
     CH2   CH3 CH        CH ------- CH2      CH—CH3
    /    \ | /     \    /                    |
  CH2      C         C                       CH3
  |        |         ||
H—C—OH     C         CH
   \      / \\      /
    CH2       CH
```

7-Dehydro-cholesterin.

Die Untersuchungen sind von methodischem Standpunkt aus u. a. deshalb interessant, weil zunächst ein Ester bereitet, chromatographiert und krystallisiert wurde, nach dessen Aufteilung das eigentliche, reine Vitamin sich freilegen ließ. Zur Isolierung aus Thunfischleberöl diente einleitend ein mehrfältiges Entmischungsverfahren; hierauf nahm man die weitgehende, chromatographische

Anreicherung des Vitamins vor. Bemerkenswert ist auch die Verwendung eines Farbstoffes zur Markierung der D_3-Zone. Die Arbeit von BROCKMANN (3) bringt gleichzeitig eine Trennung der im Leberöl enthaltenen Vitamine A und D.

```
                                          CH3
                                          |
                                          CH ---- CH2
                                         /        |
                       CH2   CH3 CH             CH2
                      /    \  |  /    \           |
                 CH2         C         CH2      CH2
                 |           |          |         |
    CH2    CH2 CH2           CH ------- CH2     CH—CH3
   /   \   ||      \        /                     |
 CH2    C           C                            CH3
 |      |           ||
H—C—OH  C           CH
  \    /  \\       /
   CH2       CH
```

Vitamin D_3.

a) Vitamin D_3 aus 7-Dehydro-cholesterin (WINDAUS, SCHENCK und WERDER). Die Benzollösung von 6,3 g 7-Dehydro-cholesterin wurde $3^3/_4$ Stunden in einer kleinen Quarzwalze mit Mg-Funken bestrahlt. Nach dem Verjagen des Benzols im Vakuum löst man den Rückstand in 60 cm³ Alkohol, versetzt ihn mit einer Lösung von 8 g Digitonin in 120 cm³ siedendem Alkohol, dampft (ohne Rücksicht auf den Niederschlag) zur Trockne und extrahiert den Rest mehrmals mit kochendem Petroläther. Der Auszug wird wieder eingedampft, das Hinterbliebene mit 15 cm³ Petroläther und 2 cm³ Citraconsäureanhydrid versetzt, dann mit so viel abs. Äther, daß klare Lösung entsteht. Nach 6tägigem Aufbewahren (20°) gibt man 40 cm³ 10proz. methanolisches Kali zu, läßt 12 Stunden stehen, verdünnt mit Wasser, schüttelt mit Petroläther aus, trocknet und dampft den Auszug im Vakuum ein. Es hinterblieb ein hellgelbes Harz, das ebensowenig krystallisierte, wie das aus einer Probe bereitete 3,5-Dinitrobenzoat.

Zur Reinigung wurde das Harz in Benzin + Benzol (4 : 1) auf Aluminiumoxyd verarbeitet. Elution mit methanolhaltigem Benzol. So wurden drei Anteile gewonnen und jeder mit 3,5-Dinitrobenzoylchlorid in Pyridin verestert. Das aus dem mittleren Säulenbezirk stammende Reaktionsgemisch schied allmählich gelbe Nadeln des Vitamin-D_3-Dinitrobenzoates $C_{34}H_{46}O_6N_2$ ab,

welche, mehrmals umkrystallisiert, bei 129° schmolzen. Nach dem Verseifen mit methanolischem KOH wurde das Vitamin in Form eines Öls gewonnen. Antirachitische Grenzdosis an der Ratte: 0,05 γ, Spektrum: wie Vitamin D_2.

b) Isolierung des Vitamins D_3 aus Thunfischleberöl (BROCKMANN 3). Alle Lösungsmittel sind sorgsam zu reinigen. Die einzelnen Fraktionen des Anreicherungsversuches wurden nach dem Entfernen des Lösungsmittels sofort in Exsiccatoren gebracht, die man viermal auf 1 mm evakuiert und jedesmal mit O-freiem CO_2 durchspült.

„A" bedeutet Vitamin-A-Gehalt, ausgedrückt in CLO-Einheiten.

„D" bedeutet Vitamin-D-Gehalt, ausgedrückt in internationalen Einheiten (IE) pro Milligramm Substanz.

Je 100 g Thunfischkonzentrat (Vitamin-D-Gehalt 0,32%; A = 2900 CLO; D = 80 IE pro Milligramm) wurden in 2 l Normalbenzin (Kahlbaum) 16mal mit je 500 cm³ 90proz. Methanol ausgeschüttelt. Die Unterschicht wurde bis zu einem 50proz. Methanolgehalt mit Wasser verdünnt und mit Benzin erschöpft. Im letzteren Auszug: 50,5 g Substanz, A = 580, D = 140. Man verdünnt mit Benzin auf 1,5 l und schüttelt 12mal mit je 500 cm³ 95proz. Methanol. Aus der methylalkoholischen Phase wurde (nach dem Verdünnen zu 50% CH_3OH) ein Benzinauszug bereitet; derselbe enthielt 30 g Substanz, A = 500, D = 280.

Je 20 g des letzteren Präparates löst man in einem Gemisch von 100 cm³ Benzol + 400 cm Normalbenzin und filtriert es durch eine Säule von „Aluminiumhydroxyd III". Nachwaschen mit 1,2 l Lösungsmittel. Im Filtrat: 5,8 g Öl, A = 550, D = 800. Je 10 g dieses Präparates wurden zusammen mit 100 mg *Indicatorrot 33* in 600 cm³ Benzol + Benzin (1 : 4) aufgenommen und durch eine *Aluminiumhydroxyd-III-Säule filtriert.* Beim Nachwaschen mit 3 l Lösungsmittel entstand das folgende Bild:

Oben: hellgelb,
rosa,
rot, enthält 2,9 g Öl, D = 2000 IE (und Indicatorrot),
unten: bräunlichgelb.

Man hat das Öl (2,9 g) in 200 cm³ Benzol + Benzin (1 : 4) gelöst, von auskrystallisiertem Indicatorrot filtriert und die Chromatographie wiederholt. Nachwaschen mit 1,5 l Lösungsmittel:

Oben: hellgelb,
rot, enthält 0,9 g Öl, D = 5500 IE (und Indicatorrot),
unten: gelb.

Das vom Solvent befreite Öl (0,9 g) wurde in 50 cm³ Benzin aufgenommen und so lange mit 20proz. methanolischem Kali (80 Vol.-% CH_3OH) durchschüttelt, bis die Benzinschicht farbstoff-frei geworden ist. Das durch Abdampfen des Benzins gewonnene Öl löste sich in wenig heißem Methanol, aus welchem beim Erkalten die Hauptmenge des Cholesterins sich abschied. Das Filtrat wurde mit Digitonin aufgekocht, zur Trockne verdampft und der Rückstand mit heißem Benzin erschöpft. Das Benzin hinterließ beim Verjagen eine cholesterinfreie Fraktion, D = 6700.

750 mg des letzteren Präparates wurden in 4 cm³ reinstem Pyridin (über BaO getrocknet) gelöst und mit einer Lösung von frisch destilliertem *3,5-Dinitro-benzoylchlorid* in 3 cm³ Pyridin versetzt. Nach kurzem Erwärmen am Wasserbad stand das Gemisch 2 Tage bei 20⁰, unter CO_2, und wurde dann in Natriumbicarbonatlösung gegossen. Man schüttelt mit Benzol durch, wäscht den Auszug mit Bicarbonat, verd. Essigsäure, schließlich mit Wasser, verdampft das Benzol, löst seinen Rückstand in 70 cm³ Benzol + Benzin 1 : 4 (eine kleine Menge hinterbleibt), gießt die Flüssigkeit auf eine Aluminiumhydroxyd-III-Säule und wäscht mit dem gleichen Lösungsmittel nach. 4 Zonen. Das Eluat der untersten Scheibe zeigt nach dem Verdampfen 10000 IE. Dies Öl wurde in wenig heißem Aceton gelöst und mit Methanol bis zur beginnenden Trübung versetzt. Das zunächst ausgefallene Öl schied büschelig vereinigte, gelbe Nadeln ab. Nach längerem Stehen im Eisschrank wurde die Mutterlauge abgegossen und aus dem Rückstand der ölige Anteil mit leicht siedendem Petroläther von den Krystallen abgelöst. Zweimaliges Umkrystallisieren aus Aceton + Methanol. Schmelzp. 128—129⁰, identisch mit dem unter a) beschriebenen Ester. Durch Verseifen (Kochen mit 5proz. methanolischem Kali, ½ Stunde, unter N_2) entsteht das ölige *Vitamin* D_3, mit einem D-Wert = 25000 IE (Ratte).

c) Versuche zur Trennung von Ergosterin (Provitamin D) und Cholesterin. Das Ergosterin enthält 3 Doppelbindungen und ist stärker adsorbierbar als Cholesterin (1 F Formeln S. 184—185).

Eine gewisse Anreicherung des Ergosterins aus *Handelscholesterin* gelang WINTERSTEIN und STEIN (1), nämlich durch Chromatographie von 20 g Rohprodukt (enthaltend 5,6 mg Ergosterin) in 300 cm³ Benzin + Hexan 1 : 1, auf aktiviertem Alu-

miniumoxyd (15 × 5,5 cm). Nach dem Entwickeln mit demselben Solvent und dem empirischen Zerschneiden der Säule in fünf gleiche Teile, wurde der Ergosteringehalt spektrographisch bestimmt:

Oben: I. Zone, enthält 4,1 g Substanz, davon 4 mg Ergosterin,
II. Zone, enthält 4,55 g Substanz, davon 1,6 mg Ergosterin,
unten: III.—V. enthalten ca. 10 g Substanz; frei von Ergosterin.

Die Ergosterin-Konzentration hat sich in der I. Schicht 3,5fach, nach einem zweiten Adsorptionsversuch 6fach angereichert.

KARRER und NIELSEN zerlegen die Benzollösung eines künstlichen Gemisches von 50 mg Cholesterin + 100 mg Ergosterin auf Al_2O_3 und waschen mit 1 l Benzol nach. Es ließen sich im Quarzlicht mehrere fluoreszierende Bezirke unterscheiden, welche getrennt und mit kochendem Äthanol + Benzol (3 : 7) eluiert wurden. Nach dem Abdampfen krystallisierte man die Rückstände aus Weingeist um.

Oben:	I. keine	Substanz,	
	II. wenig	„	(Schmelzp. 149°),
	III. mehr	„	(„ 145°),
	IV. mehr	„	(„ 139°),
	V. Spuren	„	
unten:	VI. keine	„	.

Der Stoffinhalt der Schichten III sowie IV wurde nochmals chromatographiert: die erstere Zone lieferte ein Präparat mit dem Schmelzp. 156° (Ergosterin schmilzt bei 157°), die zweite ein solches vom Schmelzp. 143° (Cholesterin: 146°). Das Ergosterin war fast rein, die Cholesterin-Fraktion noch ergosterinhaltig.

```
                                          CH3
                                          |
                                          CH-----CH
                                         /       ||
                        CH2  CH3 CH     /        CH
                       /    \ | /   \            |
                  CH2        C        CH2        CH—CH3
                  |          |        |          |
       CH2  CH3  CH          CH-------CH2        CH—CH3
      /   \  |  /    \      /                    |
   CH2     C          C                          CH3
   |       |          ||
 HOCH      C          CH
     \    / \\       /
      CH2     CH
```

Ergosterin (3 F, leichter adsorbierbar).

d) Die Isolierung von **Ergosterin aus Eiern** gelang jüngst WINDAUS und STANGE. Rohmaterial: Cholesterin aus chinesischem Trockeneigelb (Merck).

```
                                          CH3
                                          |
                                          CH      CH2
                                         /        |
                      CH2   CH3 CH            CH2
                     /    \ | /    \          |
                  CH2       C       CH2    CH2
                  |         |       |         |
    CH2   CH3 CH         CH--------CH2    CH—CH3
   /    \ | /    \      /                 |
  CH2      C        CH                  CH3
  |        |        |
 HOCH      C        CH2
   \     /   \\    /
    CH2        CH
```

Cholesterin (1 F, schwerer adsorbierbar).

Anhang. Die durch Wasserentzug aus der 6-Oxy-allocholansäure erhältlichen isomeren *Cholensäuren* können, nach WIELAND, KRAUS, KELLER und OTTAWA, zumindest partiell voneinander getrennt werden (Alkohol, Aluminiumoxyd). Unter der Quarzlampe zeigten sich vier undeutliche Fluorescenzzonen, in denen das Mengenverhältnis der Isomeren stufenweise verschoben war.

Vitamin E

(Antisterilitäts-vitamin) kann durch fraktionierte Adsorption im unverseifbaren Rest des Weizenkeimöles, nach DRUMMOND, SINGER und MACWALTER (1, 2), weitgehend angereichert werden. 33 g eines solchen Restes (gelb, ölig), aus welchem die Sterine vorher größtenteils entfernt wurden, hat man in 500 cm³ Petroläther gelöst. Beim Stehen krystallisierte Lutein aus, dessen Filtrat auf Aluminiumoxyd chromatographiert wurde (standardisiert nach BROCKMANN). Reichliches Nachwaschen mit dem genannten Solvent. Zunächst lief Farbloses durch, dann wanderte eine gelbe, kryptoxanthinhaltige Zone langsam nach unten; beide waren im Rattentest inaktiv. Nun sah das Säulenbild z. B. folgend aus:

Oben: bräunlichgelb, biologisch unwirksam,
sandgelb, kaum wirksam bei einer Tagesdosis von 2—5 mg,
dunkler gefärbt, schwach wirksam,
unten: blaß, relativ am stärksten aktiv, wirksame Tagesdosis 1 mg.

Durch öfters wiederholte Adsorption der beiden untersten Lagen konnte die Antisterilitäts-tagesgabe auf 0,1 mg herabgedrückt werden (Ratte). Ein noch günstigeres Ergebnis liefert Baumwollsamenöl; allerdings ist das Endpräparat auch hier nicht einheitlich.

Evans, Emerson und Emerson haben, ebenfalls aus Weizenkeimöl, einen Alkohol $C_{29}H_{50}O_2$, das sog. *α-Tocopherol*, in Form eines krystallisierten Allophanats isoliert. Die Verbindung hebt durch eine einmalige Gabe von 3 mg die Sterilität der Ratte auf. Die Einheitlichkeit des Allophanats (Schmelzp. 156—157°) kann man chromatographisch folgendermaßen überprüfen: Mit 100 g $CaCO_3$ (vorher 3 Stunden auf 150° erhitzt) wurde ein 3,5 cm breites Rohr beschickt. Die Benzollösung der Substanz (106 mg in wenig Benzol) ließ sich gut verarbeiten. Beim Waschen mit 1150 cm^3 des genannten Solventen wurden 26 mg Allophanat aus der Säule entfernt, welche dann in drei Teile zerschnitten wurde. Die am stärksten adsorbierte Fraktion wirkt im Rattentest ebenso wie der Stoffinhalt des Filtrates.

Vitamin K.

Dam und Schönheyder haben es jüngst versucht, diesen antihämorrhagisch wirkenden Faktor aus Alfalfa zu gewinnen und mit Hilfe von Adsorptionsmethoden zu konzentrieren. Während das Vitamin von Al_2O_3 (aus Benzin) allzu stark gebunden wird, kann vorteilhaft Puderzucker verwendet werden. Nachdem die Farbstoffe beim Waschen mit dem erwähnten Solvent eben durch die Kolonne gelaufen sind, wird der Zucker in Wasser gelöst und die Substanz mit leichtem Benzin wiederholt ausgeschüttelt. Auch Calciumcarbonat scheint verwendbar zu sein; es gibt das Adsorbierte an Alkohol + Aceton (1 : 1) wieder ab.

8. Hormone.

Isolierung von Folliculin und Equilenin aus Stutenharn (Duschinsky und Lederer).

Folliculin. Den angesäuerten Harn von trächtigen Stuten hat man, wie üblich, mit Benzol extrahiert und den Hormongehalt durch Entmischen zwischen wäßrigem Alkohol und Petroläther vorgereinigt.

5 g Konzentrat (dunkle, harzartige Masse, entspricht insgesamt 3750000 internationalen Einheiten, IE) wurden in 250 cm³ Benzol gelöst und in einer $Ca(OH)_2$-Säule zerlegt (Glasrohr 25 × 4,5 cm, mit einer Jenaer Glassinterplatte abgeschlossen). Ein Anteil des Pigments bleibt oben hängen (braun), während eine rotviolette Scheibe, die sich langsam senkt, als „Indicator" dienen kann; der folliculinreiche Bezirk befindet sich nämlich stets darüber und reicht zuweilen in den Farbring hinein. Nach dem Entwickeln mit 175 cm³ Benzol erblickt man die Farbscheibe schon fast ganz unten. Das Chromatogramm sieht dann folgendermaßen aus:

Oben:	10 dunkelbraun,	
	25 gelb,	
	50 weiß,	
	55 weiß	enthalten die Hälfte
	60 violettrötlich	des Gesamthormons,
unten:	30 gelb.	

Die folliculinreiche Zone liefert nach der Elution (Aceton, oder Lösen des Kalkes in HCl und Ausäthern) und der Behandlung mit Äther und Alkohol 140 mg Rohprodukt (6500000 IE), aus dem durch Umkrystallisieren aus Alkohol ein farbloses, reines Folliculinpräparat $C_{18}H_{22}O_2$ hervorging: Schmelzp. 258°; enthält 10000000 IE.

Equilenin. Das auf Aluminiumoxyd (Al_2O_3 nach BROCKMANN: Fasertonerde = 10 : 1) bereitete Chromatogramm enthält besser ausgebildete Farbstoffstreifen als bei der Anwendung von Kalk. Oben sieht man eine rotviolette Zone, aus der durch Acetonelution und Umkrystallisieren (Cyclohexanon) *Indirubin* $C_{16}H_{10}O_2N_2$ isoliert wurde: rötlichbraune Nadeln, Schmelzp. 315°. Unter diesem Farbstoff breitet sich der hormonreichste Säulenteil aus. Die obere Hälfte des letzteren ergab nach der Elution ein Rohprodukt, von welchem 45 mg, in 2 cm³ Alkohol gelöst, mit 2,5 cm³ 10proz. alkoholischer Pikrinsäure versetzt wurden. Alsbald krystallisierte das *Equilenin-Pikrat*: rote Nadeln, nach dem Umscheiden Schmelzp. 204—206°. Schmelzpunkt des daraus bereiteten freien Equilenins 256—258°. Weiße Nadeln.

Anhang. Das *Indirubin* wurde, nebst etwas *Indigo,* aus großen Mengen von Ratten- und Kaninchenharn isoliert, und zwar durch Extraktion mit Toluol und Aufteilung der lebhaft roten Auszüge auf Al_2O_3 (MUSAJO).

Reinigung von Hetero-auxin von einem Begleiter
(KÖGL, HAAGEN-SMIT und ERXLEBEN).

Der von den genannten Forschern im Harn entdeckte Pflanzenwuchsstoff Hetero-auxin erwies sich in allen Punkten als identisch mit der synthetischen *β-Indolyl-essigsäure* $C_{10}H_9O_2N$, er zeigte jedoch ein Drehungsvermögen. Die Identität der beiden Substanzen vorausgesetzt, mußte dem Naturprodukt eine linksdrehende Verunreinigung beigemengt sein. Tatsächlich gelang es, diese im Adsorptionsversuch zu entfernen. Wegleitend waren dabei die Farbreaktion mit Eisenchlorid-Salzsäure sowie die polarimetrische Messung.

Die Lösung von 50 mg Hetero-auxin (aus Harn) in 50 cm³ Benzol wurde durch eine Calciumcarbonat-Säule (40×4,5 cm) gesaugt. Man entwickelt nacheinander: mit 50 cm³ Benzol, mit 30 cm³ Benzol + Alkohol (10 : 1) und schließlich mit 30 cm³ Benzol + Alkohol (2 : 1). Die erwähnte Farbreaktion verlief im Filtrat negativ. Die gut trocken gesaugte Säule wurde empirisch in sechs Bezirke zerschnitten und jeder dreimal mit kaltem Alkohol extrahiert. Man verdampft die Äthanolauszüge einzeln zur Trockne:

Oben:	a)	2,9 mg,	Farbreaktion negativ,
	b)	9 ,,	schwache Farbreaktion, keine Drehung,
	c)	18 ,,	starke Farbreaktion, keine Drehung,
	d)	14 ,,	deutliche Farbreaktion, keine Drehung,
	e)	3 ,,	schwache Farbreaktion,
unten:	f)	kein nennenswerter Trockenrückstand.	

Der Adsorptionsansatz wurde wiederholt, die aus den beiden Versuchen stammenden Abdampfrückstände der Schichten b) bis e) vereinigt und gemeinsam aus Wasser umkrystallisiert. Gesamtausbeute 89 mg, Schmelzp. 165°: reines, optisch *inaktives Hetero-auxin*. Die beiden Fraktionen a) wurden ebenfalls vereinigt: 6,1 mg. $[\alpha]_D^{20} = -34,3^0$ (in Alkohol). Schmelzp. 167°, mit dem reinen Produkt jedoch keine Depression. Im WENTschen Pflanzentest unwirksam.

9. Die Chromatographie von technischen Gerbstoffextrakten

wird von GRASSMANN sowie von GRASSMANN und LANG ausgeführt und bezweckt zunächst die Charakterisierung und praktische

Unterscheidung der verwickelten Gemische. Man kann auch durch Untersuchung des auswaschbaren Bestandteiles von Ledern auf die Art des verwendeten Gerbmaterials Rückschlüsse ziehen. In allen diesen Fällen kommt man mit Hilfe der Fluorescenz-chromatographie am besten vorwärts.

Rein wäßrige Lösungen sind weniger günstig. Man versetzt z. B. 3 cm^3 konzentrierten wäßrigen Rohauszug (Trockensubstanz 20—30%) mit zwei Raumteilen Methylalkohol und saugt oder zentrifugiert, wenn nötig, die Fällung ab. Im bereits abgebildeten Apparat (S. 71) wird dann die Verteilung auf Aluminiumoxyd (auch Tonsil) oder MgO vorgenommen, indem man die fest eingestampfte Kolonne zunächst mit 2 cm^3 Methanol befeuchtet und ohne zu saugen ebensoviel Gerbextrakt nachgießt. Als Waschflüssigkeit (3—4 cm^3) dient z. B. Essigester oder Methanol + Essigester 1 : 3.

Fichtenrinden-auszug, auf Al_2O_3. Nach einem dunkleren Säulenteil (braungrau) folgt eine hell gelbgrüne Zone, sodann eine schmale, stark leuchtende gelbe Schicht, der sich unmittelbar ein ziemlich hoher, leuchtend blauer Bezirk anschließt. Saure Reaktion erhöht die Leuchtkraft des ganzen Chromatogramms, das Umgekehrte tritt im Falle einer Alkalisierung ein. Bei $p_H = 2{,}2$ erscheint oben eine schwach apfelgrüne, bei 7,7 eine schwach blaue Färbung.

Eichenholz-auszug (Al_2O_3) zeigt eine ziemlich hohe, dunkelbraune, nicht fluoreszierende Schicht, dann ein helles, grünstichiges Blau. Meist sind die beiden durch einen schmalen gelbgrünen Ring getrennt.

Quebrachoholz-auszug (neutral oder schwach sauer). Auf Al_2O_3 oben eine starke Zone mit zitronen- bis ockergelber Fluorescenz; ganz unten: grün oder schwach stahlblau. Die beiden sind durch ein schwarzes oder schmutzigbraunes, hohes Zwischenstück getrennt. Bei stärker saurer Reaktion wird die erste Zone leuchtend hellgrün, die folgende (dunklere) sienabraun oder grünlichbraun. Meist folgt noch eine grünlich- oder graublaue Nebenschicht.

Unterscheidung von Kastanien- und Eichenholz-auszug. Man versetzt den Extrakt (Trockensubstanz 20—30%) mit Bromwasser bis zum bleibenden Br-Geruch, erwärmt die Flüssigkeit am Wasserbad, bis zum Verschwinden desselben, verdünnt mit 2 Raumteilen Methanol und filtriert. Die Chromatogramme wurden zwar abgeschwächt, doch sieht man bei der Eiche eine blaugrüne, bei der Kastanie eine rein blaue Fluorescenz.

Tannin (zur Analyse, Kahlbaum) zeigt in Methanol auf MgO oder Al_2O_3 indigoblaue, einheitliche Fluorescenz.

Katechin aus Gambir, mehrmals umkrystallisiert, gibt auf Al_2O_3 eine grüne, auf MgO eine schwach stahlblaue Fluorescenz.

Tanigan O (synthetisches Gerbmittel), auf Al_2O_3: schwarz, schwe-

felgelb, dunkelbraun, rotbraun, schwefelgelb, hell gelbgrün, hellviolett.

Weitere kurze Angaben über natürliche und künstliche Gerbstoffe s. im Original.

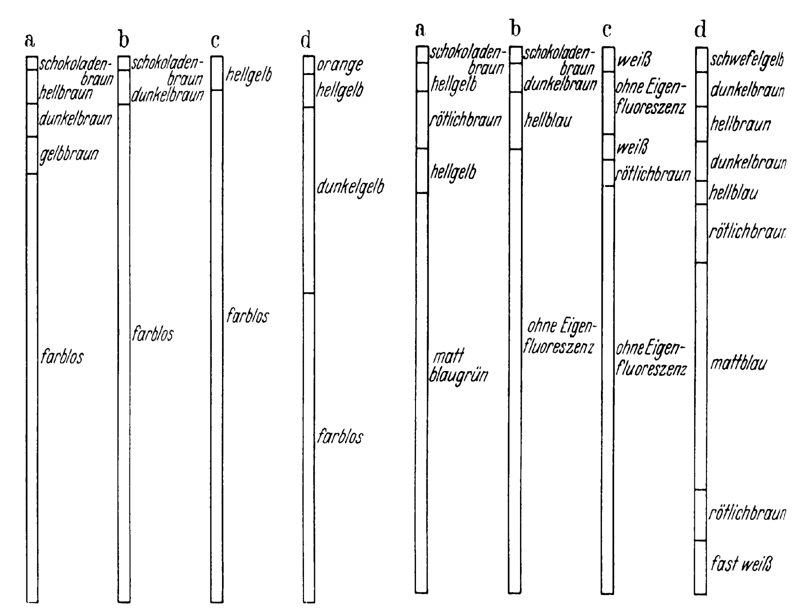


Abb. 28. Chromatogramm des Perubalsams in gewöhnlichem Licht: a natürlicher, b künstlicher Perubalsam in Alkohol; c natürlicher, d künstlicher Perubalsam in Petroläther.

Abb. 29. Chromatogramm des Perubalsams in ultraviolettem Licht. a—d wie in Abb. 28.

10. Untersuchung von pharmazeutisch verwendbaren Drogen.

Ähnlich wie Gerbstoffauszüge, lassen sich auch Extrakte aus physiologisch wirksamen Drogen, galenische Präparate usw. in vielen Fällen adsorptionsanalytisch prüfen. Das Chromatogramm oder Ultra-chromatogramm gibt über die Provenienz bzw. Herstellungsart und Qualität sehr rasch Aufschluß. Die Beispiele (Abb. 28—30) stammen von VALENTIN und beziehen sich auf die Aluminiumoxyd-Säule; Nachwaschen mit verdünntem Alkohol.

Aus dem *Perubalsam* wurden 0,5proz. alkoholische Lösungen und ferner Petrolätherlösungen bereitet (der letztere Solvent hinterläßt

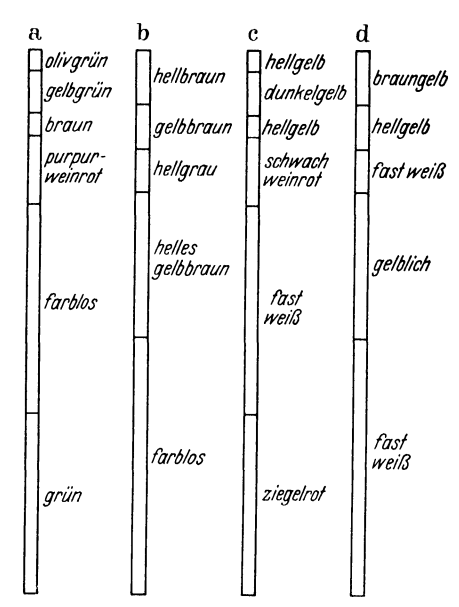
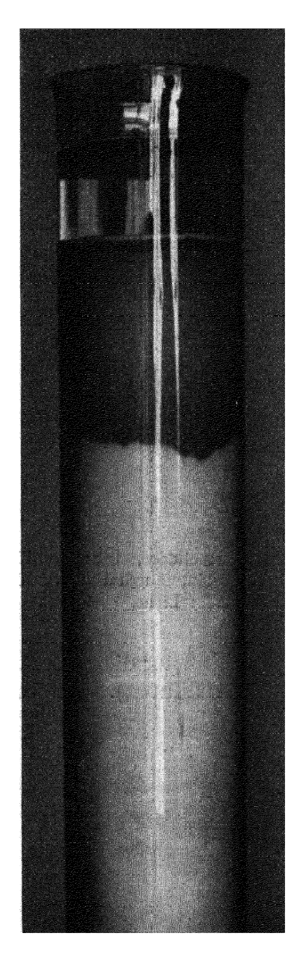


Abb. 30. Chromatogramm der Digitalistinktur: a mit absolutem, b mit verdünntem Alkohol bereitet, beide in gewöhnlichem Licht; c mit absolutem und d mit verdünntem Alkohol bereitet, beide in ultraviolettem Licht.

einen Rückstand). Zur Extraktion der *Digitalis*blätter diente entweder absoluter oder verdünnter Alkohol (Spiritus dilutus). Die erstere Arbeitsweise entspricht der offizinellen.

Photographische Aufnahmen von Chromatogrammen.



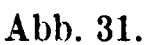


Abb. 31.

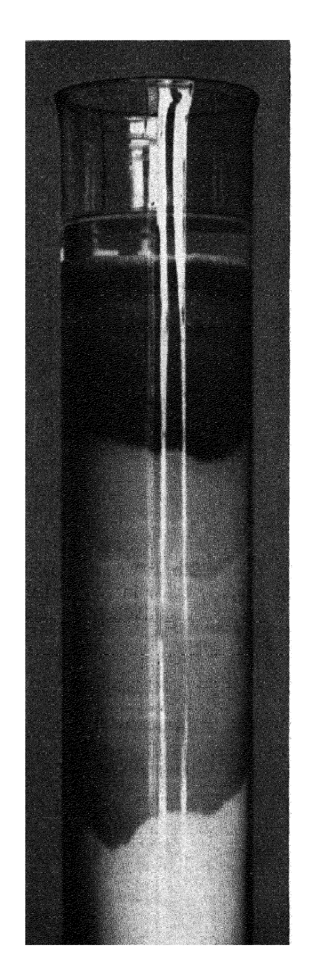


Abb. 32.

Verdrängungsvorgang. Abb. 31: Eine gelbe Zeaxanthinlösung in Benzol + Benzin (1:4) auf $CaCO_3$. Abb. 32: Auf dieselbe Säule wurde eine rote Capsanthinlösung gegossen, welche beim Entwickeln das Zeaxanthin nach unten verdrängt hat und nun dessen frühere Lage einnimmt.

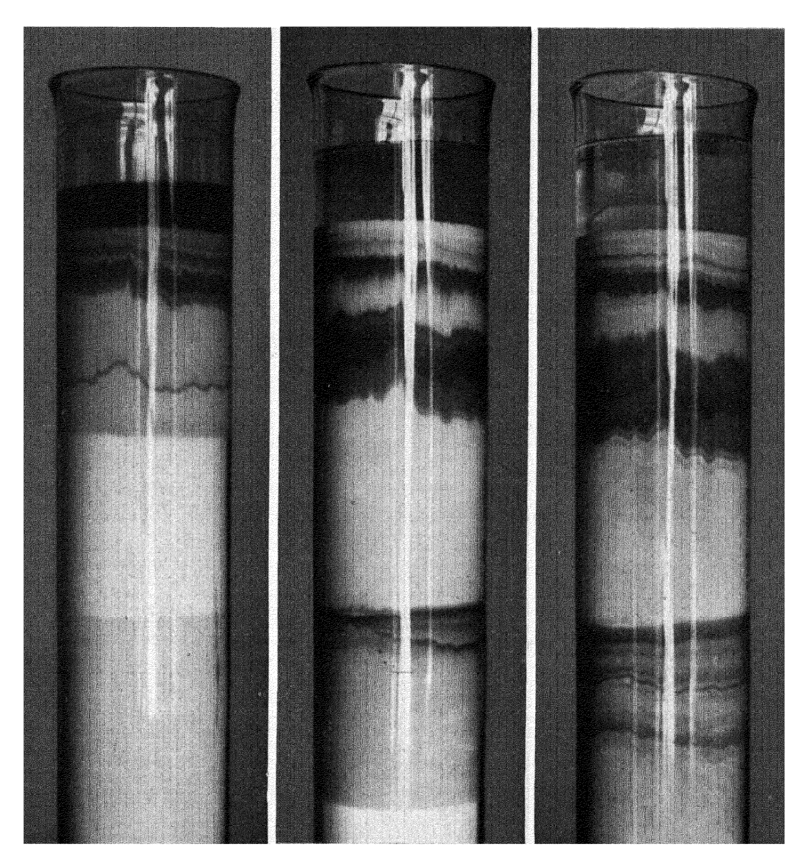


Abb. 33. Abb. 34. Abb. 35.

Ausbildung eines Chromatogramms (Paprika-Rohauszug, Benzin; das Rohr oben mit $CaCO_3$, unten mit $Ca(OH)_2$ gefüllt). Abb. 33: Sofort nach dem Aufgießen. Abb. 34: Späteres Stadium, noch ungenügend mit Benzin entwickelt. Abb. 35: Fertig entwickelt.

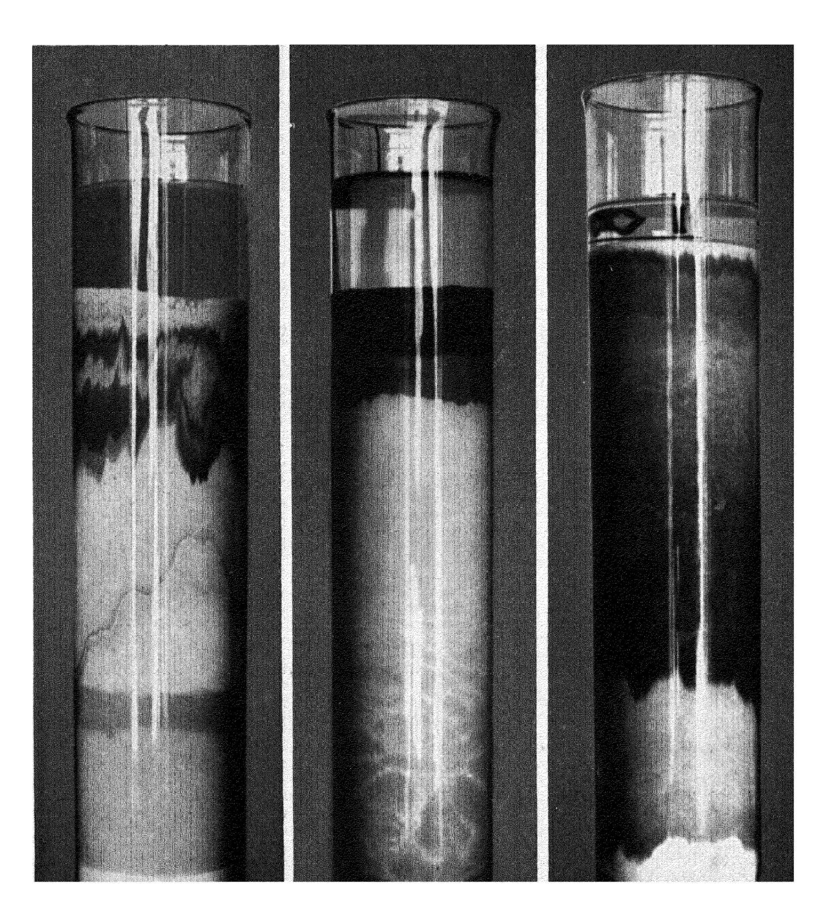


Abb. 36. Abb. 37. Abb. 38.

Unzweckmäßige Ansätze. Abb. 36: Paprika-Auszug wie Abb. 35, S. 193, das Adsorbens ungleichmäßig eingestampft. Abb. 37: Capsanthin + Zeaxanthin (Benzol, $Ca(OH)_2$), Füllmasse schlecht gewählt, Adsorption zu stark, Entwicklung erschwert. Abb. 38: Dasselbe auf $CaCO_3$, Adsorption zu schwach, Farbstofflage allzu ausgebreitet, Verhältnis zwischen Adsorbens- und Pigmentmenge ungünstig. (Die Abb. 37—41 beziehen sich auf dasselbe Farbstoff-Gemisch.)

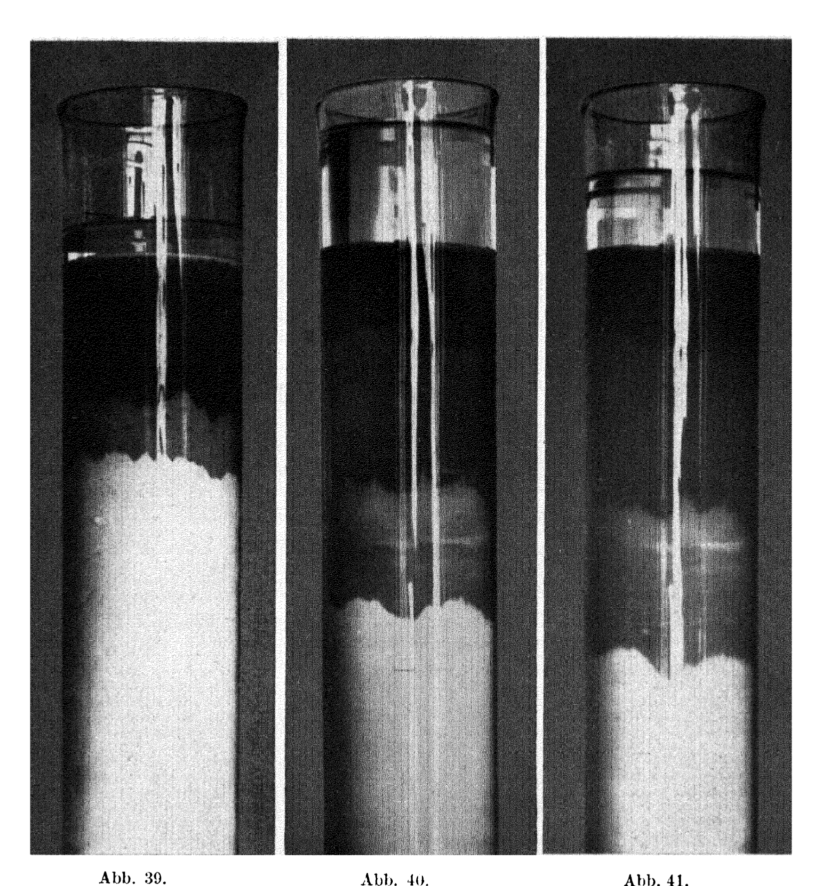


Abb. 39. Abb. 40. Abb. 41.

Einfluß des Lösungs- und Entwicklungsmittels. Capsanthin + Zeaxanthin auf $CaCO_3$. Abb. 39: Benzol + Benzin (1:10) entwickeln unzureichend. Abb. 40: Benzol + Benzin (1:4); richtig entwickelt. Abb. 41: mit Schwefelkohlenstoff richtig entwickelt. (Die Abb. 37 bis 41 beziehen sich auf dasselbe Farbstoffgemisch.)

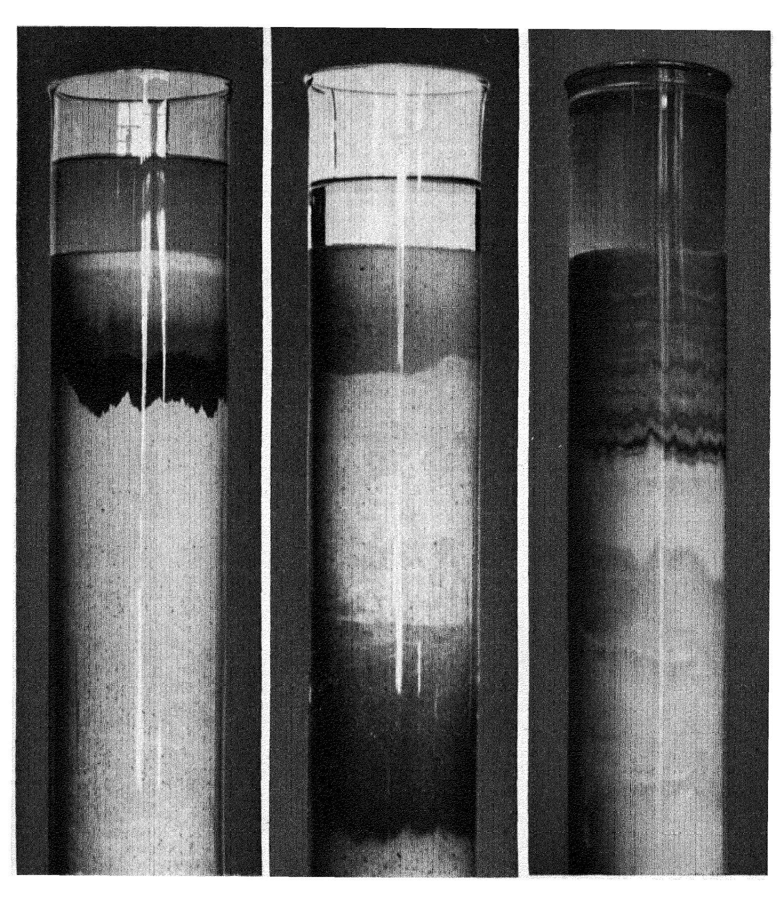


Abb. 42. Abb. 43. Abb. 44.

Einfluß von Verunreinigungen. Abb. 42: Lycopinhaltiger Pflanzenextrakt (Benzin, $Ca(OH)_2$). Abb. 43: Dasselbe, vor dem Aufgießen mit Schweinefettlösung versetzt. Abb. 44: Rohauszug der Orangenschale (CS_2, $CaCO_3$); die natürlichen Begleiter des Lipochroms gestatten hier die unmittelbare Ausbildung eines feindifferenzierten Säulenbildes.

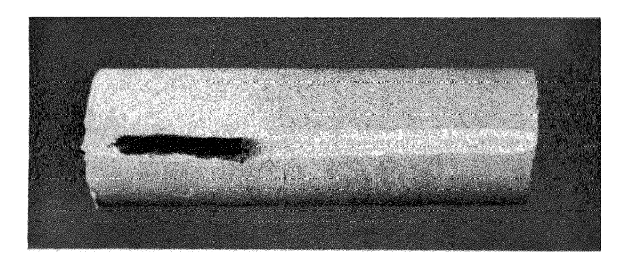


Abb. 45.

Nachweis des Vitamins A mit Hilfe der Pinselmethode. Die Benzinlösung wurde auf $Ca(OH)_2$ chromatographiert und die ausgepreßte, farblos gebliebene Säule mit dem CARR-PRICE-Reagens bestrichen.

Literaturverzeichnis.

Die Zusammenstellung reicht bis zum Winter 1936 sie erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Während der Drucklegung erschienene Arbeiten konnten im Haupttext nicht mehr gebührend berücksichtigt werden. Nachstehend sind auch einige Abhandlungen zitiert, in welchen noch ein älteres Adsorptionsverfahren angewandt wurde und deren Ergebnis gute Unterlagen für die Chromatographie liefert.

ACKERMANN, D. u. H. G. FUCHS: Zur Adsorption stickstoffhaltiger Substanzen aus wäßrigen Lösungen. Ztschr. physiol. Chem. **240**, 198 (1936).

ADLER, E. u. M. MICHAELIS: Über die Komponenten der Dehydrasesysteme. X. Zur Kenntnis der Milchsäurehydrase und der Apfelsäuredehydrase aus Herzmuskel. Ztschr. physiol. Chem. **238**, 261 (1936).

AMMUNDSEN, E.: Untersuchungen über das Unverseifbare aus Rattenfaeces. Biochem. Ztschr. **284**, 313 (1936).

ARDASCHEW, B. I.; Zur Methodik der Untersuchung von Rohanthracen. Ind. org. Chem. **1**, 353 (1936) [russ.]

ARMSTRONG, K. F.: Neue Gebiete in der organischen Chemie. Chem. Age **31**, 590 (1934).

ASKEW, F. A., S. N. FARMER u. G. A. R. KON: Sapogenine. I. Die Sapogenine der Sarsaparilla-Wurzel. Journ. chem. Soc. London **1936**, 1399.

AXELROD, E.: Dissertation. Zürich, 1935.

BACHSTEZ, M. u. G. CAVALLINI: Beitrag zur Kenntnis südamerikanischer Drogen. I. Über „Bixol", ein neuer Alkohol aus dem Öl von Bixa Orellana. — II. Über die chemische Zusammensetzung von Convallaria obtusifolia. Chim. et Ind. **17**, 650 (1935).

BARKAN, G. u. O. SCHALES: Hämoglobin und „leicht abspaltbares" Eisen bei der Adsorption und bei der Kataphorese. Ztschr. physiol. Chem. **244**, 257 (1936).

BECKER, E. u. C. SCHÖPF: Der mikrochemische Nachweis der Pterine in Insekten. Liebigs Ann. **524**, 124 (1936).

BERNHAUER, K.: Einführung in die organisch-chemische Laboratoriumstechnik. Berlin: Julius Springer. 1934.

BERTHO, A. u. W. GRASSMANN: Biochemisches Praktikum. Leipzig: Walter de Gruyter. 1936.

BOWDEN, F. P. u. S. H. BASTOW: Physikochemische Untersuchungen komplexer organischer Moleküle. III. Oberflächeneigenschaften

von Vitamin-A-Konzentraten. Proceed. Roy. Soc., London, Serie B, **116**, 27 (1934).
BROCKMANN, H.: (1) Die Carotinoide der Aprikose (Prunus armeniaca). Ztschr. physiol. Chem. **216**, 45 (1933).
— (2) Die Konstitution des Alkannins, Shikonins und Alkannans. Liebigs Ann. **521**, 1 (1936).
— (3) Die Isolierung des antirachitischen Vitamins aus Thunfischleberöl. Ztschr. physiol. Chem. **241**, 104 (1936).
BROCKMANN, H. u. R. HAASE: Über Dracorubin, den roten Farbstoff des „Drachenblutes". I. Mitt. Ber. Dtsch. chem. Ges. **69**, 1950 (1936).
BROCKMANN, H. u. M. L. TECKLENBURG: Der A-Vitamingehalt der Rattenleber nach Fütterung mit α-, β- und γ-Carotin und die Antimontrichloridreaktion von A-Vitaminpräparaten. Ztschr. physiol. Chem. **221**, 117 (1933).
BROCKMANN, H. u. O. VÖLKER: Der gelbe Federfarbstoff des Kanarienvogels [Serinus canaria canaria (L.)] und das Vorkommen von Carotinoiden bei Vögeln. Ztschr. physiol. Chem. **224**, 193 (1934).
BRUNNER, O. u. E. BARONI: Zur Kenntnis der Netzhautstoffe. IV. Über die Flavine der Netzhaut. Monatsh. Chem. **68**, 264 (1936).
BURCKARDT, G. N., I. M. HEILBRON, H. JACKSON, E. G. PARRY u. J. A. LOVERN: Gefärbte Seetieröle. I. Farbstoffe des Seeteufels (Lophius piscatorius), der Steingarnele (Nephrops norvegicus) und des Wals. Biochemical Journ. **28**, 1698 (1934).
CASTLE, D. C., A. E. GILLAM, I. M. HEILBRON u. H. W. THOMPSON: Adsorptionsversuche mit Vitamin-A-Konzentraten. Biochemical Journ. **28**, 1702 (1934).
CHARGAFF, E.: (1) Über die Carotinoide der Bakterien. Compt. rend. Acad. Sciences **197**, 946 (1933).
— (2) Untersuchung der Carotinoidpigmente einiger Bakterien. Ann. Inst. Pasteur **52**, 415 (1934).
CHARGAFF, E. u. J. DIERYCK: Die Pigmente der Sarcina lutea. Naturwiss. **20**, 872 (1932).
CHARGAFF, E. u. E. LEDERER: Über die carotinoiden Farbstoffe von zwei säurebeständigen Bakterien. Ann. Inst. Pasteur **54**, 393 (1935).
CHOLNOKY, L. v.: (1) Die Verwendung der fraktionierten Adsorption bei der Isolierung natürlicher, organischer Verbindungen. Magyar chem. Foly. **39**, 138 (1933) (ungar.).
— (2) Untersuchung des Capsicum annuum-Pigments mit Hilfe von Adsorptionsmethoden. Ber. ung. pharmaz. Ges. **9**, 400 (1935) (ungarisch).
CLAR, E.: Über eine Gesetzmäßigkeit im Aufbau der Absorptionsspektren aromatischer Kohlenwasserstoffe. Ber. Dtsch. chem. Ges. **66**, 202 (1933).
COOK, A. H.: Chromatographische Analyse. Chem. and Ind. **55**, 724 (1936).

COOK, J. W., C. L. HEWETT u. I. HIEGER: Die Isolierung eines krebserzeugenden Kohlenwasserstoffes aus Steinkohlenteer. Journ. chem. Soc. London **1933**, 395.

COWARD, K. H.: Einige Beobachtungen über die Extraktion und Schätzung der Lipochrome aus tierischen und pflanzlichen Geweben. Biochemical Journ. **18**, 1114 (1924).

CRIEGEE, R.: Zwischenprodukte bei Dehydrierungen mit Chinonen. Ber. Dtsch. chem. Ges. **69**, 2758 (1936).

DAM, H.: Die chromatographische Adsorptionsanalyse. Kem. Maan. nord. Handelsbl. kem. Ind. **16**, 121 (1935) (dän.).

DAM, H. u. F. SCHÖNHEYDER: Das Vorkommen und die chemische Natur des Vitamins K. Biochemical Journ. **30**, 897 (1936).

DÁNIEL, E. v. u. T. BÉRES: Zur Kenntnis des Lipochroms im menschlichen Blutserum. Ztschr. physiol. Chem. **238**, 160 (1936).

DÁNIEL, E. v. u. G. J. SCHEFF: Eine verbesserte Methode zur Bestimmung des Blut-Carotins. Proceed. Soc. exp. Biol. Med. **33**, 26 (1935).

DAS, N.: Über die Komponenten der Dehydrasesysteme. XI. Zur Kenntnis der Glucosedehydrase aus Leber. Ztschr. physiol. Chem. **238**, 269 (1936).

DHÉRÉ, CH.: Umwandlung von Helicohaematin zu Haematoporphyrin. Journ. Physiol. et Pathol. gén. **1917**, 67.

DHÉRÉ, CH. u. A. RAFFY: Untersuchungen über die Fluoreszenz-Spektrochemie der Chlorophyll-Farbstoffe. Bull. Soc. Chim. biol. **17**, 1385 (1935).

DHÉRÉ, CH. u. G. VEGEZZI: (1) Über die pigmentäre Zusammensetzung des Hepatochlorophylls. Compt. rend. Acad. Sciences (2), **1916**, 399.

— (2) Über das Helicorubin. Compt. rend. Acad. Sciences (1) **1917**, 869.

— (3) Untersuchungen über das Helicorubin. Journ. Physiol. et Pathol. gén. **1917**, 44, 53.

DIELS, O. u. H. F. RICKERT: Über den Identitäts-Nachweis des Dehydrierungs-Kohlenwasserstoffes $C_{18}H_{16}$ aus Sterinen und Geninen mit γ-Methyl-cyclopentano-phenanthren. Ber. Dtsch. chem. Ges. **68**, 267 (1935).

DRUMMOND, J. C., A. S. RUIZ u. T. THORBJARNARSON: Anwendung der chromatographischen Adsorptionsanalyse zur Untersuchung der Zusammensetzung des unverseifbaren Rückstandes von Fischölen. Anales Soc. Española Fisica Quim. **33**, 680 (1935).

DRUMMOND, J. C., E. SINGER u. R. J. MACWALTER: (1) Eine Untersuchung über die unverseifbare Fraktion von Weizenkeimöl, mit besonderer Berücksichtigung von Vitamin E. Biochemical Journ. **29**, 456 (1935).

— (2) Weitere Beobachtungen an den Bestandteilen der unverseifbaren Fraktion von Weizenkeimöl, mit besonderer Berücksichtigung von Vitamin E. Biochemical Journ. **29**, 2510 (1935).

DUSCHINSKY, R. u. E. LEDERER: Isolierung des Follikulins und des Equilenins durch chromatographische Adsorption. Bull. Soc. Chim. biol. **17**, 1534 (1935).

ECKART, O.: Die Verfahren zur Aufbereitung gebrauchter Bleicherden. Chem.-Ztg. **60**, 153 (1936).

EEKELEN, M. van, A. EMMERIE, H. W. JULIUS u. L. K. WOLFF: Scheidung von Formen des A-Vitamins, gegründet auf die Antimontrichloridreaktion. Nature **132**, 171 (1933).

ELLINGER, PH. u. W. KOSCHARA: Über eine neue Gruppe tierischer Farbstoffe (Lyochrome). Ber. Dtsch. chem. Ges. **66**, 315 (1933).

EMMERIE, A.: Die Carr-Price-Reaktion der Fettsäuren des Dorschlebertranes nach energischer Verseifung. Nature **136**, 183 (1935).

EMMERIE, A., M. VAN EEKELEN, B. JOSEPHY u. L. K. WOLFF: Salmensäure, ein Carotinoid aus dem Lachs. Acta Brevia neerl. Physiol. **4**, 139 (1934).

EULER, H. v. u. E. ADLER: Über die Komponenten der Dehydrasesysteme. IX. Die Co-Dehydrasen: Co-Zymase und „Co-Dehydrase II“. Co-Zymase als Wasserstoffüberträger. Ztschr. physiol. Chem. **238**, 233 (1936).

EULER, H. v. u. K. M. BRANDT: Blaufluoreszierende Substanz im Corpus luteum. Naturwiss. **23**, 544 (1935); Ark. Kemi, Mineral. Geol. (B), **11**, Nr. 51 (1935).

EULER, H. v. u. U. GARD: Adsorptionsversuche an Carotinoiden. Ark. Kemi, Mineral. Geol. (B), **10**, Nr. 19 (1931).

EULER, H. v., U. GARD u. H. HELLSTRÖM: Carotinoide und Vitamin A in tierischen und pflanzlichen Organen. Svensk Kem. Tidskr. **44**, 191 (1932).

EULER, H. v., P. KARRER, E. ADLER u. M. MALMBERG: Über die Wachstumswirkung der Flavine. Helv. chim. Acta **17**, 1157 (1934).

EULER, H. v., P. KARRER u. O. WALKER: Über ein Oxyd des Carotins. Helv. chim. Acta **15**, 1507 (1932).

EULER, H. v. u. M. MALMBERG: (1) Ascorbinsäure im Diabetikerharn. Svensk Kem. Tidskr. **47**, 55 (1935).

— (2) Vitamine und Katalysatoren in Weizen-Embryonen. Ark. Kemi, Mineral. Geol. (B), **12**, Nr. 14 (1936).

EULER, H. v. u. F. SCHLENK: Zusammensetzung des Co-Zymasemoleküls. Svensk Kem. Tidskr. **48**, 135 (1936).

EVANS, H. M., O. H. EMERSON u. G. A. EMERSON: Die Isolierung eines Alkohols, α-Tocopherol aus Weizenkeimöl, welcher die Eigenschaften von Vitamin E besitzt. Journ. biol. Chemistry **113**, 319 (1936).

FABRE, R. u. E. LEDERER: (1) Notiz über die Anwesenheit von Astacin in den Crustaceaen. Compt. rend. Soc. Biologie **113**, 344 (1933).

— (2) Beitrag zum Studium der tierischen Lipochrome. Bull. Soc. Chim. biol. **16**, 105 (1934).

FISCHER, H. u. K. BAUER: Purpurine, Rhodine und Rhodinporphyrine aus Chlorophyll b. Neue Analogien zwischen Chlorophyll a und b. Liebigs Ann. **523**, 235 (1936).

FISCHER, H. u. J. HASENKAMP: (1) Über die Konstitution des Farbstoffes der Purpurbakterien und über 9-Oxy-desoxo-phäoporphyrin a_5. Liebigs Ann. **515**, 148 (1935).

— (2) Überführung der Vinylgruppe des Chlorophylls und seiner Derivate den Oxäthyl-rest sowie über Oxo-pyrroporphyrin. Liebigs Ann. **519**, 42 (1935).

FISCHER, H. u. H. J. HOFMANN: Synthese des Desoxo-phyllerythroätioporphyrins. Liebigs Ann. **517**, 274 (1935).

FISCHER, H. u. H. MEDICK: Über die Einwirkung von Diazo-essigester auf einige Chlorophyllderivate. Liebigs Ann. **517**, 245 (1935).

FISCHER, H. u. W. SCHMIDT: Teilsynthese des Phäophytins und einiger weiterer Phäophorbid-ester. Liebigs Ann. **519**, 244 (1935).

FISCHER, H. u. G. SPIELBERGER: Teilsynthese von Äthyl-chlorophyllid b sowie über 10-Äthoxy-methylphäophorbid b. Liebigs Ann. **515**, 130 (1935).

FISCHER, H. u. F. STADLER: Gewinnung von Dihydropyrophäophorbid a und Pyrophäophorbid b aus Schafkot. Ztschr. physiol. Chem. **239**, 167 (1936).

FOX, D. L.: (1) Weitere Studien der Carotinoide von zwei Fischen des Pazifik, Fundulus parvipinnis und Hypsypops rubicunda, und von einer Meeres-annelide, Thoracophelia sp. Proceed. National Acad. Sciences, Washington **22**, 50 (1936).

— (2) Fundort und Nahrung der Californischen Seemuschel. Bull. Scripps Inst. Oceanogr. **4**, 1 (1936).

FRISCH, CH., E. LEDERER u. L. WILLHEIM: Lipochrome und Glykolyse. Bull. Soc. Chim. biol. **18**, 401 (1936).

FUJISE, SH. u. A. NAGASAKI: Über optisch-aktive Flavanone. II. Die optische Spaltung von Oxy-flavanonen. Ber. Dtsch. chem. Ges. **69**, 1893 (1936).

GAFFRON, H.: (1) Über den Mechanismus der Sauerstoff-Aktivierung durch belichtete Farbstoffe. II. Mitt.: Photooxydation im nahen Infrarot. Ber. Dtsch. chem. Ges. **68**, 1409 (1935).

— (2) Über die Kohlensäureassimilation der roten Schwefelbakterien II. Biochem. Ztschr. **279**, 1 (1935).

GATTERMANN, L. u. H. WIELAND: Die Praxis des organischen Chemikers, 24. Aufl. Berlin-Leipzig: Walter de Gruyter. 1936.

GILLAM, A. E. u. I. M. HEILBRON: (1) Die Carotinoide der Butter. Biochemical Journ. **29**, 834 (1935).

— (2) Vitamin-A-aktive Substanzen im Eidotter. Biochemical Journ. **29**, 1064 (1935).

GILLAM, A. E. u. M. S. EL RIDI: (1) Die Adsorption von Grass- und Buttercarotin an Tonerde. Nature **136**, 914 (1935).

— (2) Carotinoide und Vitamin A im Blutserum der Kuh. Biochemical Journ. **29**, 2465 (1935).

GILLAM, A. E. u. M. S. EL RIDI: (3) Die Isomerisation von Carotinen durch chromatographische Adsorption. I. Pseudo-α-Carotin. Biochemical Journ. **30**, 1735 (1936).

GOPPELSROEDER, F.: Anregung zum Studium der Capillaranalyse. Basel. 1906.

GRASSMANN, W.: Über chromatographische Adsorptionsanalyse von Gerbstoffen. Collegium **9**, 401 (1935).

GRASSMANN, W. u. O. LANG: Über die chromatographische Adsorptionsanalyse von Gerbstoffen. Collegium **9**, 114 (1935).

GREENE, R. D. u. A. BLACK: Die Extraktion von Vitamin B_1 aus Adsorbaten. Science **84**, 185 (1936).

HAMANO, S.: Bull. Inst. phys. chem. Res. (Abstr.), Tokyo **13**, 89 (1934).

HAYASHI, F.: Adsorption von Zuckern an Aktivkohle. Journ. Biochemistry **16**, 1 (1932).

HEILBRON, I. M., R. N. HESLOP, R. A. MORTON, E. T. WEBSTER, J. L. REA u. J. C. DRUMMOND: Charakterisierung hochaktiver Vitamin-A-Präparate. Biochemical Journ. **26**, 1178 (1932).

HEILBRON, I. M., H. JACKSON u. R. N. JONES: Die Lipochrome von See-Anemonen. I. Carotinoide Pigmente von Actinia aequina, Anemonia sulcata, Actinoloba dianthus und Tealia felina. Biochemical Journ. **29**, 1384 (1935).

HEILBRON, I. M. u. B. LYTHGOE: Die Chemie der Algen. II. Die carotinoiden Pigmente der Oscillatoria rubrescens. Journ. chem. Soc. London **1936**, 1376.

HEILBRON, I. M., E. G. PARRY u. R. F. PHIPERS: (1) Die Algen. II. Die Verwandtschaft zwischen gewissen Gehaltsstoffen von Algen. Biochemical Journ. **29**, 1376 (1935).

— (1) Die Algen. III. Die Isolierung von Lactoflavin. Biochemical Journ. **29**, 1382 (1935).

HEILBRON, I. M. u. R. F. PHIPERS: Die Algen. I. Die Lipochrome des Fucus vesiculosus. Biochemical Journ. **29**, 1369 (1935).

HESSE, G.: (1) Über physikalische Methoden im chemischen Laboratorium. Die chromatographische Analyse und ihre Anwendung. Angew. Chem. **49**, 315 (1936).

— (2) Über das Drachenblut. Liebigs Ann. **524**, 14 (1936).

HILLEMANN, H.: Zur Kenntnis des „Sterinkohlenwasserstoffs $C_{18}H_{16}$" und über zwei Isomere desselben. Ber. Dtsch. Chem. Ges. **69**, 2610 (1936).

HOFMEIER, H., S. WISSELINCK u. A. MÜLLER: Versuche zur Entschwefelung eines rohen Braunkohlenleichtöls mit Hilfe von Adsorptionsmitteln. Angew. Chem. **47**, 513 (1934).

HOLMES, H. N. u. J. A. ANDERSON: Eine neue Art von Kieselsäuregel. Ind. engin. Chem. **17**, 280 (1925).

HOLMES, H. N., H. CASSIDY, R. S. MANLY u. E. R. HARTZLER: Darstellung eines kräftig wirkenden Vitamin-A-Konzentrats. Journ. Amer. chem. Soc. **57**, 1990 (1935).

HOLMES, H. N., V. G. LAVA, E. DELFS u. H. G. CASSIDY: Vergleichende Untersuchungen über das Adsorptionsverhalten von rohem Vitamin A, Carotin und Cholesterin. Journ. biol. Chemistry **99**, 417 (1933).

INGRAHAM, M. A. u. H. STEENBOCK: Die Beziehung von Mikroorganismen zu Carotinoiden und Vitamin A. II. Die Erzeugung von Carotinoiden durch Mycobacterium Phlei. Biochemical Journ. **29**, 2553 (1935).

JACOBS, W. A. u. M. HEIDELBERGER: Sarmentocymarin und Sarmentogenin. Journ. biol. Chemistry **81**, 765 (1929).

JENSEN, P.: Die Bedeutung der chromatographischen Adsorptionsanalyse für die Untersuchung von Teerfarbstoffen und Zwischenprodukten. Dissertation, Eidg. Techn. Hochschule Zürich, 1936.

KARRER, P.: Chemie der Vitamine A und C. Chem. Reviews **14**, 17 (1934).

KARRER, P., H. v. EULER u. U. SOLMSSEN: Oxydationsprodukte des α-Carotins. Über Zusammenhänge zwischen Konstitution und Vitamin-A-Wirkung. Helv. chim. Acta **17**, 1169 (1934).

KARRER, P. u. H. HÜBNER: Capsanthol, ein Reduktionsprodukt des Capsanthins. Helv. chim. Acta **19**, 474 (1936).

KARRER, P. u. R. MORF: Synthese des Perhydrovitamins A. Reinigung der Vitamin-A-Präparate. Helv. chim. Acta **16**, 625 (1933).

KARRER, P., R. MORF u. K. SCHÖPP: Zur Kenntnis des Vitamins A aus Fischtranen. Helv. chim. Acta **14**, 1036, 1431 (1931).

KARRER, P., R. MORF u. O. WALKER: (1) Konstitution des α-Carotins. Nature **132**, 171 (1933).

— (2) Konstitution des α-Carotins. Helv. chim. Acta **16**, 975 (1933).

KARRER, P. u. N. NIELSEN: Trennung von Substanzgemischen im Chromatogramm und Ultrachromatogramm. Zangger-Festschrift, S. 954. Zürich: Rascher & Co. 1934.

KARRER, P. u. A. OSWALD: Carotinoide aus den Staubbeuteln von Lilium tigrinum. Ein neues Carotinoid: Antheraxanthin. Helv. chim. Acta **18**, 1303 (1935).

KARRER, P., H. SALOMON u. K. SCHÖPP: Isolierung des Hepaflavins. Helv. chim. Acta **17**, 419 (1934).

KARRER, P. u. W. SCHLIENTZ: Zum Vorkommen von α- und β-Carotin in verschiedenen Naturprodukten. Helv. chim. Acta **17**, 7 (1934).

KARRER, P. u. K. SCHÖPP: (1) Trennung von Vitamin A, Carotin und Xanthophyllen. Helv. chim. Acta **15**, 745 (1932).

— (2) Filtrationen bei tiefer Temperatur. Chromatographische Analyse farbloser Substanzen (Ultrachromatogramm). Helv. chim. Acta **17**, 693 (1934).

— (3) Isolierung des Lyochroms aus Eigelb (Ovoflavin g). Helv. chim. Acta **17**, 735 (1934).

— (4) Isolierung eines pflanzlichen Flavins. Helv. chim. Acta **17**, 771 (1934).

KARRER, P., K. SCHÖPP u. R. MORF: Zur Kenntnis der isomeren Carotine und ihre Beziehungen zum Wachstumsvitamin A. Helv. chim. Acta **15**, 1158 (1932).

KARRER, P. u. U. SOLMSSEN: (1) Zur Kenntnis der Oxydationsprodukte der Carotine. Das Carotinoid der Thiocystis-Bakterien. Helv. chim. Acta **18**, 25 (1935).

— (2) Die Carotinoide der Purpurbakterien I. Helv. chim. Acta **18**, 1306 (1935).

— (3) Die Carotinoide der Purpurbakterien. II. Über Rhodoviolascin. Helv. chim. Acta **19**, 3 (1936).

— (4) Überführung von Rhodoxanthin in Zeaxanthin. Helv. chim. Acta **18**, 477 (1935).

— (5) Über das Vorkommen von Carotinoiden bei einigen Meerestieren. Helv. chim. Acta **18**, 915 (1935).

— (6) Carotinoide aus Purpurbakterien. III. Helv. chim. Acta **19**, 1019 (1936).

KARRER, P., U. SOLMSSEN u. O. WALKER: Vorläufige Mitteilung über neue Oxydationsprodukte aus α-Carotin und Physalien. α-Carotin-dijodid. Helv. chim. Acta **17**, 417 (1934).

KARRER, P. u. F. M. STRONG: (1) Reindarstellung von Anthocyanen durch chromatographische Analyse. Helv. chim. Acta **19**, 25 (1936).

— (2) Synthetische Versuche in der Flavinreihe. Helv. chim. Acta **19**, 483 (1936).

KARRER, P. u. O. WALKER: (1) Reines α-Carotin. Helv. chim. Acta **16**, 641 (1933).

— (2) Untersuchungen über die herbstlichen Färbungen der Blätter. Helv. chim. Acta **17**, 43 (1934).

KARRER, P., O. WALKER, K. SCHÖPP u. R. MORF: Isomere Formen des Carotins und die weitere Reinigung von Vitamin A. Nature **132**, 26 (1933).

KARRER, P. u. H. M. WEBER: Zerlegung natürlicher Anthocyangemische durch chromatographische Adsorptionsanalyse. II. Über „Althaein“. Helv. chim. Acta **19**, 1025 (1936).

KARRER, P. u. H. WEHRLI: 25 Jahre Vitamin-A-Forschung. Nova Acta Leopoldina (Halle a. S.), N. F. **1**, 175—275 (1933).

KOLTHOFF, I. M., W. v. FISCHER u. CH. ROSENBLUM: Die Adsorption von Wollviolett (4 BN) durch Bleisulfat und der Einfluß des adsorbierten Farbstoffs auf die Geschwindigkeit des kinetischen Austausches. Journ. Amer. chem. Soc. **56**, 832 (1934).

KOLTHOFF, I. M. u. CH. ROSENBLUM: Die spezifische Oberfläche und die Adsorptionseigenschaften von Bleisulfat. Journ. Amer. chem. Soc. **55**, 851, s. auch 2664 (1933).

KOSCHARA, W.: (1) Über ein Lyochrom aus Harn (Uro-flavin). Ber. Dtsch. chem. Ges. **67**, 761 (1934).

— (2) Über die Einwirkung von Licht auf Lyochrome. Ztschr. physiol. Chem. **229**, 103 (1934).

KOSCHARA, W.: (3) Über Harnlyochrome. Ztschr. physiol. Chem. **232**, 101 (1935).

— (4) Adsorptionsanalyse wäßriger Lösungen. Ztschr. physiol. Chem. **239**, 89 (1936).

— (5) Isolierung eines gelben Farbstoffes (Uropterin) aus Menschenharn. Ztschr. physiol. Chem. **240**, 127 (1936).

KÖGL, F. u. W. B. DEIJS: Untersuchungen über Pilzfarbstoffe. XII. Die Synthese von Boletol und Isoboletol. Liebigs Ann. **515**, 23 (1935).

KÖGL, F., A. J. HAAGEN-SMIT u. H. ERXLEBEN: Über ein neues Auxin (Hetero-auxin) aus Harn. Ztschr. physiol. Chem. **228**, 90 (1934).

KRÄNZLIN: Anatomische und farbstoffanalytische Untersuchungen an panachierten Pflanzen. Dissertation. Berlin, 1908.

KRAUT, H.: Methoden der Adsorption und Elution. In OPPENHEIMER-PINKUSSEN, Methodik der Fermente. Leipzig: Georg Thieme. 1929.

KUHN, R. u. H. BROCKMANN: (1) α-Carotin aus Palmöl. Ztschr. physiol. Chem. **200**, 255 (1931).

— (2) Prüfung von α- und β-Carotin an der Ratte (Über das Vitamin des Wachstums, II. Mitt.). Ber. Dtsch. chem. Ges. **64**, 1859 (1931).

— (3) Bestimmung von Carotinoiden. Ztschr. physiol. Chem. **206**, 41 (1932).

— (4) Hydrierungs- und Oxydationsprodukte der Carotine als Vorstufen des A-Vitamins. Ztschr. physiol. Chem. **213**, 1 (1932).

— (5) Flavoxanthin. Ztschr. physiol. Chem. **213**, 192 (1932).

— (6) Über die ersten Oxydationsprodukte des β-Carotins. Ber. Dtsch. chem. Ges. **65**, 894 (1932).

— (7) Über ein neues Carotin. Naturwiss. **21**, 44 (1933).

— (8) γ-Carotin (Über das Vitamin des Wachstums, IV. Mitt.). Ber. Dtsch. chem. Ges. **66**, 407 (1933).

— (9) Über Rhodoxanthin, den Arillus-Farbstoff der Eibe (Taxus baccata). Ber. Dtsch. chem. Ges. **66**, 828 (1933).

— (10) Semi-β-carotinon; ein Verfahren zur Ausführung chemischer Reaktionen. Ber. Dtsch. chem. Ges. **66**, 1319 (1933).

— (11) Über die Wachstumswirkung der Carotine und Xanthophylle. Ztschr. physiol. Chem. **221**, 129 (1933).

— (12) Die Konstitution des β-Carotins. (Vorläuf. Mitt.) Ber. Dtsch. chem. Ges. **67**, 885 (1934).

— (13) Über das β-Oxy-carotin. Ber. Dtsch. chem. Ges. **67**, 1408 (1934).

— (14) Über den stufenweisen Abbau und die Konstitution des β-Carotins. Liebigs Ann. **516**, 95 (1935).

KUHN, R. u. A. DANSI: Über eine molekulare Umlagerung von N-Glucosiden. Ber. Dtsch. chem. Ges. **69**, 1745 (1936).

KUHN, R. u. A. DEUTSCH: Die Konstitution des Azafrins. Ber. Dtsch. chem. Ges. **66**, 883 (1933).

KUHN, R. u. CH. GRUNDMANN: (1) Die Konstitution des Lycopins. Ber. Dtsch. chem. Ges. **65**, 1880 (1932).
— (2) Die ersten Oxydationsprodukte des Lycopins. Ber. Dtsch. chem. Ges. **65**, 898 (1932).
— (3) Über Krypthoxanthin, ein Xanthophyll der Formel $C_{40}H_{56}O$ (Über das Vitamin des Wachstums, V. Mitt.). Ber. Dtsch. chem. Ges. **66**, 1746 (1933).
— (4) Über Rubixanthin, ein neues Xanthophyll der Formel $C_{40}H_{56}O$. Ber. Dtsch. chem. Ges. **67**, 339 (1934).
— (5) Kryptoxanthin aus gelbem Mais (Über das Vitamin des Wachstums, VI. Mitt.). Ber. Dtsch. chem. Ges. **67**, 593 (1934).
— (6) Über die sterischen Reihen der Xanthophylle. Ber. Dtsch. chem. Ges. **67**, 596 (1934).
— (7) Über einen neuen Weg zum Aufbau von Polyenen; Synthese der Hexatrien-1.6- und Oktatetraen-1.8-dicarbonsäure. Ber. Dtsch. chem. Ges. **69**, 1757 (1936).
KUHN, R., P. GYÖRGY u. TH. WAGNER-JAUREGG: (1) Über eine neue Klasse von Naturfarbstoffen. Ber. Dtsch. chem. Ges. **66**, 317 (1933).
— (2) Über Ovoflavin, den Farbstoff des Eiklars. Ber. Dtsch. chem. Ges. **66**, 576 (1933).
— (3) Über Lactoflavin, den Farbstoff der Molke. Ber. Dtsch. chem. Ges. **66**, 1034 (1933).
KUHN, R. u. H. KALTSCHMITT: Isolierung von Lactoflavin (Vitamin B_2) aus Heu. Ber. Dtsch. chem. Ges. **68**, 128 (1935).
KUHN, R. u. E. LEDERER: (1) Zerlegung des Carotins in seine Komponenten (Über das Vitamin des Wachstums, I. Mitt.). Ber. Dtsch. chem. Ges. **64**, 1349 (1931).
— (2) Taraxanthin, ein neues Xanthophyll mit 4 Sauerstoffatomen. Ztschr. physiol. Chem. **200**, 108 (1931).
— (3) Über α- und β-Carotin. Ztschr. physiol. Chem. **200**, 246 (1931).
— (4) Iso-carotin (Über das Vitamin des Wachstums, III. Mitt.). Ber. Dtsch. chem. Ges. **65**, 637 (1932).
— (5) Über Taraxanthin. Ztschr. physiol. Chem. **213**, 188 (1932).
KUHN, R., E. LEDERER u. A. DEUTSCH: Astacin aus den Eiern der Seespinne (Maja squinado). Ztschr. physiol. Chem. **220**, 229 (1933).
KUHN, R., K. REINEMUND, F. WEYGAND u. R. STRÖBELE: Über die Synthese des Lactoflavins (Vitamin B_2). Ber. Dtsch. chem. Ges. **68**, 1765 (1935).
KUHN, R. u. H. RUDY: 6.7-Dimethyl-flavin-9-essigsäure. Ber. Dtsch. chem. Ges. **68**, 300 (1935).
KUHN, R. u. A. SMAKULA: Spektrophotometrische Analyse des Eidotterfarbstoffes. Ztschr. physiol. Chem. **197**, 161 (1931).
KUHN, R., TH. WAGNER-JAUREGG u. H. KALTSCHMITT: Über die Verbreitung der Flavine im Pflanzenreich. Ber. Dtsch. chem. Ges. **67**, 1452 (1934).
KUHN, R. u. F. WEYGAND: Synthese des 6.7-Dimethyl-9-n-amylflavins. Ber. Dtsch. chem. Ges. **67**, 1941 (1934).

KUHN, R. u. A. WINTERSTEIN: (1) Viola-xanthin, das Xanthophyll des gelben Stiefmütterchens (Viola tricolor). Ber. Dtsch. chem. Ges. **64**, 326 (1931).

— (2) Reduktion mit Zinkstaub in Pyridin (III. Mitt.). Unkehrbare Hydrierung und Dehydrierung der Chlorophylle. Ber. Dtsch. chem. Ges. **66**, 1741 (1933).

— (3) Ketten-Verkürzung und Cyclisierung beim thermischen Abbau natürlicher Polyen-Farbstoffe. Ber. Dtsch. chem. Ges. **66**, 1733 (1933).

— (4) Über die Konstitution des Pikrocrocins und seine Beziehung zu den Carotin-Farbstoffen des Safrans. Ber. Dtsch. chem. Ges. **67**, 344 (1934).

— (5) Über konjugierte Doppelbindungen I—IV. Helv. chim. Acta **11**, 87, 116, 123, 144 (1928).

— (6) Zur Kenntnis der Aethylengruppe als Chromophor. Helv. chim. Acta **12**, 899 (1929).

KUHN, R., A. WINTERSTEIN u. E. LEDERER: Zur Kenntnis der Xanthophylle. Ztschr. physiol. Chem. **197**, 141 (1931).

LEDERER, E.: (1) Die chromatographische Adsorption und ihre Anwendungen. Chim. et Ind. **33**, 1072 (1935).

— (2) Les caroténoïdes des plantes. Paris: Herrmann et Cie. 1934.

— (3) Les caroténoïdes des animaux. Paris: Herrmann et Cie. 1935.

— (4) Über die Carotinoide einer roten Hefe (Torula rubra). Compt. rend. Acad. Sciences **197**, 1694 (1933).

— (5) Notiz über die Lipochrome der Actinia equina (L.). Compt. rend. Soc. Biologie **113**, 1391 (1933).

— (6) Über die Carotinoide des Teguments einiger Insekten (Coccinella septempunctata, Pyrrhocoris apterus, Oedipoda miniata). Compt. rend. Soc. Biologie **117**, 413 (1934).

— (7) Über die Carotinoide von drei Ascidien (Halocynthia papillosa, Dendrodoa grossularia, Botryllus Schlosseri). Compt. rend. Soc. Biologie **117**, 1083 (1934).

— (8) Über ein neues Carotinoid, gefunden in der Jacobsmuschel (Pecten maximus). Compt. rend. Soc. Biologie **116**, 150 (1934).

— (9) Über die Carotinoide von einigen Pilzen. Compt. rend. Soc. Biologie **117**, 1083 (1935).

— (10) Echinenon und Pentaxanthin; zwei neue Carotinoide, gefunden im Seeigel (Echinus esculentus). Compt. rend. Acad. Sciences **201**, 300 (1935).

— (11) Die chromatographische Adsorption und ihre Anwendungen. Shurn. obschtschei Chim. **6**, 499 (1936) (russ.).

LEDERER, E. u. T. MOORE: Echinenon als Provitamin A. Nature **137**, 996 (1936).

LIPMAA, TH.: Über die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Rhodoxanthins. Compt. rend. Acad. Sciences **182**, 867 (1926).

MACKINNEY, G.: (1) Blattcarotine. Journ. biol. Chemistry **111**, 75 (1935).
— (2) Über die Plastidpigmente der Sumpf-Flachsseide. Journ. biol. Chemistry **112**, 421 (1935).

MACKINNEY, G. u. H. W. MILNER: Karottenblatt-Carotin. Journ. Amer. chem. Soc. **55**, 4728 (1933).

MALMBERG, M. u. H. v. EULER: Körpergewichtszunahme durch Körner von Weizen, Hafer und Gerste bei Vitamin-A-frei ernährten Ratten. Biochem. Ztschr. **284**, 238 (1936).

MARCHLEWSKI, L.: (1) Zur Chemie des Chlorophylls. Biochem. Ztschr. **5**, 344 (1907).
— (2) Zur Phylloxanthinfrage. Biochem. Ztschr. **7**, 284 (1908).
— (3) Über die Dualität der Chlorophyllane. Biochem. Ztschr. **32**, 332 (1911).

MARK, H. u. G. SAITO: Fraktionierung hochpolymerer Stoffe durch die chromatographische Adsorptionsanalyse. I. Fraktionierung von Acetylcellulose. Monatsh. Chem. **68**, 237 (1936).

MATLACK, M. B.: Die Pigmente der roten Grapefruits, Citrus grandis (L., Osbeck). Journ. biol. Chemistry **110**, 249 (1935).

MILLER, E. S.: Verbesserte Methoden zur Reinigung der gewöhnlichen Carotinoide und die quantitative Messung ihrer Adsorptionsspektra. Bot. Gaz. 96, 447 (1935).

MOHLER, H. u. W. HÄMMERLE: (1) Chromatographischer und spektrophotometrischer Nachweis von künstlicher Färbung in Wein. Ztschr. Unters. Lebensmittel **70**, 193 (1933).
— (2) Über den Nachweis von Weißwein in Rotwein. Ztschr. Unters. Lebensmittel **71**, 186 (1936).

MOLODENSKI, W. S.: Adsorption von aliphatischen Säuregemischen. Chimtsch. Schurn. W. **2**, 125 (1931) (russ.).

MUSAJO, L.: Über die Synthese der Xanthurensäure und über chromatographische Untersuchungen. Ric. sci. Progresso tecn. Econ. naz. [2] **7**, II. 95 (1936).

NERACHER, O. u. T. REICHSTEIN: Anreicherung von Vitamin D aus Thunfischleberöl. Helv. chim. Acta **19**, 1382 (1936).

NIEL, C. B. VAN u. J. H. C. SMITH: Studien über die Pigmente der Purpurbakterien I. Arch. Mikrobiol. **6**, 219 (1935).

PALMER, L. S.: (1) Carotinoids and related pigments. New York: The chemical Catalog Co. 1922.
— (2) Carotin, der natürliche, gelbe Hauptfarbstoff des Milchfettes. Dissertation. Univ. Missouri, 1913.

PALMER, L. S. u. C. H. ECKLES: (1) Chemische und physiologische Beziehungen der Milchfettpigmente zum Carotin und Xanthophyll der grünen Pflanzen. Journ. biol. Chemistry **17**, 191, 211, 223, 237, 245 (1914).
— (2) Carotin, der natürliche, gelbe Hauptfarbstoff des Milchfettes. Missouri Agr. exper. Stat. **9**, 313; **10**, 339; **11**, 391; **12**, 415 (1914).

PETTER, H. F. M.: (1) Über Bakterien von gesalzenem Fisch. Amsterd. Akad. Wiss. **34**, Nr. 10 (1931).
— (2) Über rote und andere Bakterien von gesalzenem Fisch. Dissertation. Sandpoort, 1932 (holl.).
PFAU, A. ST. u. PL. PLATTNER: Zur Kenntnis der flüchtigen Pflanzenfarbstoffe. IV. Über die Konstitution der Azulene. Helv. chim. Acta **19**, 858 (1936).
ŘETOVSKY, R.: Atmungsmodelle mit dem System Sonnenblumenöl + Carotinoide. Bull. Soc. Chim. biol. **17**, 1614 (1935).
ŘETOVSKY, R. u. A. URBAN: Das Pigment des Sonnenblumenöles aus subkarpathischem Rußland. Die chromatographische Methode in der Chemie der Öle. Chemičký Obzor Nr. 12 (1934) (tschech.).
ROGOWSKI, W. DE: Untersuchungen über die ultravioletten Absorptionsspektren und über die Fluoreszenz-Emmissionsspektren der Chlorophyll-Farbstoffe. Dissertation. Fribourg, 1912; Varsovie, 1914.
RUDY, H.: Die Adsorptionsanalyse von Haptengemischen. Biochem. Ztschr. **253**, 204 (1932).
RUGGLI, P. u. P. JENSEN: (1) Die chromatographische Adsorptionsanalyse in Anwendung auf wässerige Lösungen künstlicher organischer Farbstoffe. Helv. chim. Acta **18**, 624 (1935).
— (2) Chromatographische Adsorption von Teerfarbstoffen und Zwischenprodukten. II. Derivate des α- und β-Naphtols. Helv. chim. Acta **19**, 64 (1936).
SANDOZ, Chem. Fabrik vorm. (Basel): Verfahren zur Trennung, Zerlegung und Reindarstellung von Mutterkornalkaloiden. DRP. 627.027 und Franz. P. 788.812 (1936).
SCHERTZ, F. M.: Die reinen Farbstoffe, Carotin und Xanthophyll und die Tswettsche Adsorptionsmethode. Plant Physiol. **4**, 337 (1929).
SCHNEIDER, E.: Über die Carotinoide der Purpurbakterien. Beiträge zur Physiologie der Farbstoffe der Purpurbakterien (III. Mitteilung). Rev. Fac. Sci. Univ. Istambul **2**, 74 (1936).
SCHNEIDER, J. Z. u. K. WILLERT, Wasserschierling (Cicuta virosa L.). IV. Chromatographische Analyse der Lösungen aus den frischen Wurzeln. Chem. Obzor, **11**, 107 (1936).
SCHÖN, K.: Studien an Carotinoiden. I. Die Carotinoide der Diospyros-Früchte. II. Die Carotinoide der Arbutus-Früchte (Arbutus unedo). Biochemical Journ. **29**, 1779 (1935).
SCHÖPF, C. u. E. BECKER: Über neue Pterine. Liebigs Ann. **524**, 49 (1936).
SCHÜRCH, O. u. A. WINTERSTEIN: Über die krebserregende Wirkung aromatischer Kohlenwasserstoffe. Ztschr. physiol. Chem. **236**, 79 (1935); s. auch Ztschr. Krebsforsch. **42**, 76 (1935).
SIEDEL, W.: Synthese des Glaukobilins, sowie über Urobilin und Mesobiliviolin. Ztschr. physiol. Chem. **237**, 8 (1935).
SÖRENSEN, N. A.: (1) Die Farbstoffe des Tranes von Orthagoriscus mola. Norske Vidensk. Selsk. Forh. **6**, 154 (1933).

SÖRENSEN, N. A: (2) Die Leberpigmente des Seeteufels (Lophius piscatorius). Norske Vidensk. Selsk. Skr. **1934**, Nr. 1.

— (3) Chromatographische Adsorptionsanalyse. Tidskr. Kemi Bergvaesen **15**, 53 (1935).

STIX, W.: Die chromatographische Adsorptionsanalyse. Uspechi Chimii **5**, 4 (1936) (russ.).

STOKLASA, J., V. BRDLIK u. A. ERNEST: Zur Frage des Phosphorgehaltes des Chlorophylls. Ber. Dtsch. botan. Ges. **27**, 10 (1909).

STOLL, A. u. E. WIEDEMANN: Über Chlorophyll a, seine phasepositiven Derivate und seine Allomerisation. Helv. chim. Acta **16**, 739 (1933).

STRAIN, H. H.: (1) Die Trennung von Carotinen durch Adsorption auf Magnesiumoxyd. Science **79**, 325 (1934).

— (2) Carotin. VIII. Trennung von Carotinen durch Adsorption. Journ. biol. Chemistry **105**, 523 (1934).

— (3) Carotin. IX. Carotine aus verschiedenen Quellen und einige Eigenschaften von α- und β-Carotin. Journ. biol. Chemistry **111**, 85 (1935).

— (4) Blatt-Xanthophylle. Science **83**, 241 (1936).

— (5) 3-Nitrobenzohydrazone, 2.4-Dinitrophenylhydrazone und die Trennung von Hydrazonen durch Adsorption. Journ. Amer. chem. Soc. **57**, 758 (1935).

— (6) Petrolätherlösliche, fluoreszierende Bestandteile von Blättern. Nature **137**, 946 (1936).

SUMNER, F. B. u. D. L. FOX: Studien über carotinoide Pigmente in Fischen. III. Die Einflüsse von eingeführten Carotinoiden auf den Xanthophyllgehalt von Fundulus parvipinnis. Proceed. National Acad. Sciences, Washington **21**, 330 (1935).

SÜLLMANN, H., E. SZÉCSÉNYI-NAGY u. F. VERZÁR: Differenzierung der Serumfarbstoffe des Menschen. Biochem. Ztschr. **283**, 263 (1936).

TAUBER, H.: Die selektive Adsorption von Enzymen durch Cellulose. Journ. biol. Chemistry **113**, 754 (1936).

TAYLOR, W. J. u. E. M. W. LAVINGTON: Die heterogene Katalyse von stereoisomerem Wechsel bei Oximen. Journ. chem. Soc. London **1934**, 980.

THORBJARNARSON, T. u. J. C. DRUMMOND: Vorkommen eines ungesättigten Kohlenwasserstoffs in Olivenöl. Analyst **60**, 23 (1935).

THORBJARNARSON, T., A. S. RUIZ u. J. C. DRUMMOND: Selektive Adsorption in der Untersuchung der unverseifbaren Substanz von marinen Ölen. Analyst **60**, 382 (1935).

TISCHER, J.: (1) Über das Euglenarhodon und andere Carotinoide einer roten Euglene (Carotinoide der Süßwasseralgen I). Ztschr. physiol. Chem. **239**, 257 (1936).

— (2) Über die Carotinoide und die Bildung von Jonon in Trentepohlia, nebst Bemerkungen über den Gehalt dieser Alge an Erythrit. Ztschr. physiol. Chem. **243**, 103 (1936).

TREIBS, A.: Chlorophyll- und Häminderivate in bituminösen Gesteinen, Erdölen, Erdwachsen und Asphalten. Liebigs Ann. **510**, 42 (1934).

TSCHESCHE, R. u. K. BOHLE: Über pflanzliche Herzgifte. XIII. Die Konstitution des Sarmentogenins. Ber. Dtsch. Chem. Ges. **69**, 2497 (1936).

TSCHESCHE, R. u. H. A. OFFE: (1) Über Krötengifte, I. Mitt.: Die Selen-Dehydrierung des Cinobufagins. Ber. Dtsch. chem. Ges. **68**, 1998 (1935).

— (2) Über Krötengifte, II. Mitt.: Zur Kenntnis des Cino- und Marinobufagins. Ber. Dtsch. chem. Ges. **69**, 2361 (1936).

TSUCHIYA, Y.: Enzymchemische Untersuchungen über die Gifte der Formosa-Schlangen VI. Über die Adsorption und Elution des aktiven Bestandteiles des Giftes von Taiwankobura... Mem. Fac. Sci. Agric. Taihoku **9**, 309 (1936).

TSWETT, M.: (1) Die Chromophylle in der Pflanzen- und Tierwelt. (Chromofilli w rastitelnom i schivotnom Mirje.) Warschau: Tipogr. Warshawakago utschebnago Okruga. 1910 (russ.).

— (2) Über die Konstitution des Farbstoffes der Blätter. Compt. rend. Acad. Sciences **129**, 607 (1899).

— (3) Über das blaue Chlorophyllin. Compt. rend. Acad. Sciences **131**, 842 (1901).

— (4) Über die Mehrzahl der Chlorophylline und über dieMetachlorophylline. Compt. rend. Acad. Sciences **132**, 149 (1901).

— (5) Über eine neue Kategorie von Adsorptionserscheinungen und ihre Anwendung in der biochemischen Analyse. Arb. Naturf. Ges. Warschau **14**, (1903).

— (6) Kritische Bemerkungen zu MOLISCH's Arbeit über die Phaeophyceen-Farbstoffe. Botan. Ztg. **63**, 273 (1905).

— (7) Zur Kenntnis der Phaeophyceen-Farbstoffe. Ber. Dtsch. botan. Ges. **24**, 235 (1906).

— (8) Physikalisch-chemische Studien über das Chlorophyll. Die Adsorptionen. Ber. Dtsch. botan. Ges. **24**, 316 (1906).

— (9) Beiträge zur Kenntnis der Anthocyane. Über künstliches Anthocyan. Biochem. Ztschr. **58**, 225 (1914).

— (10) Zur Chemie des Chlorophylls. Über Phylloxanthin, Phyllocyanin und die Chlorophyllane. Biochem. Ztschr. **5**, 6 (1907).

— (11) Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls. Ber. Dtsch. botan. Ges. **24**, 384 (1906).

— (12) Zur Geschichte der Chlorophyllforschung. Ber. Dtsch. botan. Ges. **25**, 71 (1907).

— (13) Spektralanalytische Untersuchungen über die Chlorophylline und deren nächste Säurederivate. Ber. Dtsch. botan. Ges. **25**, 137 (1907).

— (14) Nochmals über das Phylloxanthin. Biochem. Ztschr. **6**, 373 (1907).

TSWETT, M.: (15) Zur Chemie des Chlorophylls. Über das Phäophytin und die Chlorophylle nebst Schlußbemerkungen über das Phylloxanthin. Biochem. Ztschr. **10**, 404 (1908).

— (16) Über die Natur des sogenannten „krystallisierbaren Chlorophylls“ (Metachlorophyllins). Biochem. Ztschr. **10**, 414 (1908).

— (17) Über die nächsten Säurederivate der Chlorophylline. Ber. Dtsch. chem. Ges. **41**, 1352 (1908).

— (18) Über das Pigment des herbstlich vergilbten Laubes. Ber. Dtsch. botan. Ges. **26**a, 94 (1908).

— (19) Ist der Phosphor an dem Aufbau der Chlorophylline beteiligt? Ber. Dtsch. botan. Ges. **26**a, 214 (1908).

— (20) Das sogenannte „krystallisierte Chlorophyll“ — ein Gemisch. Ber. Dtsch. chem. Ges. **43**, 3139 (1910).

— (21) Über die Löslichkeitsverhältnisse der Chlorophylline und eine neue Methode zur Isolierung derselben. Ber. Dtsch. chem. Ges. **44**, 1124 (1911).

— (22) Über den makro- und mikrochemischen Nachweis des Carotins. Ber. Dtsch. botan. Ges. **29**, 630 (1911).

— (23) Über die Dualität der Chlorophyllane. Biochem. Ztschr. **31**, 505 (1911).

— (24) Über einen neuen Pflanzenfarbstoff, das Thujorhodin. Compt. rend. Acad. Sciences **152**, 788 (1911).

— (25) Der gegenwärtige Stand der Chlorophyllchemie. Journ. Russ. phys.-chem. Ges. **44**, 449 (1912) (russ.).

TUZSON, P.: Untersuchungen über das Lipochrom von menschlichen und tierischen Lebern. Pécs 1936 (ungar.)

VALENTIN: Chromatographische Adsorptionsanalyse in der Pharmazie (I. Mitt.). Pharmaz. Ztg. **80**, 469 (1935).

VEGEZZI, G.: Untersuchungen über einige Pigmente der Invertebraten: Helicorubin, Hepatochlorophyll, Tetronerythrin. Dissertation. Fribourg, 1916.

VERMAST, P. G. F.: Die Carotinoide von Citrus aurantium. Naturwiss. **19**, 442 (1931).

VERNE, J.: Les pigments dans l'organisme animal. Paris: Doin et Cie. 1926.

VÖLKER, O.: Über den gelben Federfarbstoff des Wellensittichs (Melopsittacus undulatus [Shaw]). Journ. ornithol. **84**, 618 (1936).

WAGNER-JAUREGG, TH.: Die Acridinsalze der Adenosinpolyphosphorsäuren. Ztschr. physiol. Chem. **239**, 188 (1936).

WALDENSTRÖM, J.: Untersuchungen über Harnfarbstoffe, hauptsächlich Porphyrine, mittels der chromatographischen Analyse. Dtsch. Arch. klin. Med. **178**, 38 (1935); Ztschr. physiol. Chem. **239**, III (1936).

WHITEHORN, J. C.: Eine chemische Methode zur Bestimmung von Epinephrin im Blut. Journ. biol. Chemistry **108**, 633 (1934).

WIELAND, H., A. HARTMANN u. H. DIETRICH: Über Chinovasäure. Liebigs Ann. **522**, 191 (1936).
WIELAND, H., G. HESSE u. R. HÜTTEL: Zur Kenntnis der Krötengiftstoffe. IX. Weiteres zur Konstitutionsfrage. Liebigs Ann. **524**, 203 (1936).
WIELAND, H., K. KRAUS, H. KELLER u. H. OTTAWA: Untersuchungen über die Konstitution der Gallensäuren (LIV. Mitt.). Über einige ungesättigte Gallensäuren. Ztschr. physiol. Chem. **241**, 47 (1936).
WIJNGAARDEN, J. C. H. VAN: Carotin, Vitamin A und Vitamin C in der Kuhmilch. Dissertation. Utrecht, 1935 (holl.).
WILLSTAEDT, H.: (1) Über chromatographische Analyse und ihre Anwendungen. Svensk Kem. Tidskr. **48**, 32 (1936).
— (2) Carotinoide, Bakterien- und Pilzfarbstoffe. Stuttgart: Ferdinand Enke. 1934.
— (3) Astacin aus den Schalen des Flußkrebses (Potamobius [Astacus] fluviatilis). Svensk Kem. Tidskr. **46**, 205, 261 (1934).
— (4) Die Vitamine. Klin. Wchschr. **14**, 841 (1935), **15**, 1505 (1936).
— (5) Über die Farbstoffe der Früchte von Rosa rugosa Thunb. Svensk Kem. Tidskr. **47**, 112 (1935).
— (6) Über die Farbstoffe des echten Reizkers (Lactarius deliciosus L.). Ber. Dtsch. chem. Ges. **68**, 333 (1935).
— (7) Über die Farbstoffe des echten Reizkers (Lactarius deliciosus L.) (II. Mitt.). Ber. Dtsch. chem. Ges. **69**, 997 (1936).
WILLSTAEDT, H. u. T. LINDQUIST: Über die Carotinoide des Serums und der Leber beim Menschen I. Ztschr. physiol. Chem. **240**, 10 (1936).
WILLSTÄTTER, R.: (1) Über Pflanzenfarbstoffe. Ber. Dtsch. chem. Ges. **47**, 2831 (1914).
— (2) Bemerkungen zur Geschichte der Enzymadsorption. In: Untersuchungen über Enzyme, Bd. I, S. 66. Berlin: Julius Springer. 1928.
WILLSTÄTTER, R. u. H. J. PAGE: Über die Pigmente der Braunalgen. Liebigs Ann. **404**, 237 (1914).
WILLSTÄTTER, R. u. A. STOLL: Untersuchungen über Chlorophyll. Methoden und Ergebnisse (S. 16, 156, 234). Berlin: Julius Springer. 1913.
WINDAUS, A., FR. SCHENCK u. F. v. WERDER: Über das antirachitisch wirksame Bestrahlungsprodukt aus 7-Dehydro-cholesterin. Ztschr. physiol. Chem. **241**, 100 (1936).
WINDAUS, A. u. O. STANGE: Über das Provitamin des Eiersterins. Ztschr. physiol. Chem. **244**, 218 (1936).
WINTERSTEIN, A.: (1) Fraktionierung und Reindarstellung von Pflanzenfarbstoffen nach dem Prinzip der chromatographischen Adsorptionsanalyse. G. KLEINS Handb. d. Pflanzenanalyse, Bd. IV, S. 1403—1437. Wien: Julius Springer. 1933.
— (2) Über ein Vorkommen von γ-Carotin. Ztschr. physiol. Chem. **219**, 249 (1933).

WINTERSTEIN, A.: (3) Über ein neues Provitamin A. Ztschr. physiol. Chem. **215**, 51 (1933).

WINTERSTEIN, A. u. U. EHRENBERG: Über die Verbreitung und Natur der Carotinoide in Beeren. Ztschr. physiol. Chem. **207**, 25 (1932).

WINTERSTEIN, A. u. C. FUNK: Vitamine. G. KLEINS Handb. d. Pflanzenanalyse, Bd. IV, S. 1041—1108. Wien: Julius Springer. 1933.

WINTERSTEIN, A. u. K. SCHÖN: (1) Fraktionierung und Reindarstellung organischer Substanzen nach dem Prinzip der chromatographischen Adsorptionsanalyse. III. Mitt.: Gibt es ein Chlorophyll c? Ztschr. physiol. Chem. **230**, 139 (1934).

— (2) Fraktionierung und Reindarstellung organischer Substanzen nach dem Prinzip der chromatographischen Adsorptionsanalyse. IV. Mitt.: Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe. Ztschr. physiol. Chem. **230**, 146 (1934).

— (3) Über die farbigen Kohlenwasserstoffe des Steinkohlenteers. Naturwiss. **22**, 237 (1934).

WINTERSTEIN, A., K. SCHÖN u. H. VETTER: Fraktionierung und Reindarstellung organischer Substanzen nach dem Prinzip der chromatographischen Adsorptionsanalyse. V. Mitt.: Anthracen, Chrysen, Pyren. Ztschr. physiol. Chem. **230**, 158 (1934).

WINTERSTEIN, A. u. G. STEIN: (1) Fraktionierung und Reindarstellung organischer Substanzen nach dem Prinzip der chromatographischen Adsorptionsanalyse. I. Mitt.: Anwendungsbereich. Ztschr. physiol. Chem. **220**, 247 (1933).

— (2) Fraktionierung und Reindarstellung organischer Substanzen nach dem Prinzip der chromatographischen Adsorptionsanalyse. II. Mitt.: Chlorophylle. Ztschr. physiol. Chem. **220**, 263 (1934).

WINTERSTEIN, A. u. H. VETTER: Fraktionierung und Reindarstellung organischer Substanzen nach dem Prinzip der chromatographischen Adsorptionsanalyse. VI. Mitt.: 1.2-Benzpyren. Ztschr. physiol. Chem. **230**, 169 (1934).

WINTERSTEIN, A., H. VETTER u. K. SCHÖN: Zur Synthese des krebserregenden 3.4-Benzpyrens. Ber. Dtsch. chem. Ges. **68**, 1079 (1935).

YAMAMOTO, R. u. S. TIN: Über Carotinoide in der Frucht von Citrus poonensis Hort. Bull. Inst. physic. chem. Res. **12**, 25 (1933).

YOUNG, R. T. u. D. L. FOX: Struktur und Funktion des Darmes in „surf perches“ (Embiotocidae) in bezug auf ihr Carotinoid-Stoffwechsel. Biol. Bull. **71**, 217 (1936).

ZECHMEISTER, L.: (1) Carotinoide. Ein biochemischer Bericht über pflanzliche und tierische Polyenfarbstoffe. Berlin: Julius Springer. 1934.

— (2) Carotinoide höherer Pflanzen. G. KLEINS Handb. d. Pflanzenanalyse, Bd. III, S. 1239—1350. Wien: Julius Springer. 1932.

ZECHMEISTER, L.: (3) Lipochrom und Vitamin A. SCHÖNFELD-HEFTER, Chemie und Technologie der Fette und Fettprodukte, Bd. I, S. 149—193. Wien: Julius Springer. 1936.

— (4) Die Carotinoide und ihre physiologische Bedeutung. Chem.-Ztg. **60,** 505 (1936).

ZECHMEISTER, L., T. BÉRES u. E. UJHELYI: Zur Pigmentierung der reifenden Kürbisblüte (Cucurbita Pepo). Ber. Dtsch. chem. Ges. **68,** 1321 (1935); **69,** 573 (1936).

ZECHMEISTER, L. u. L. v. CHOLNOKY: (1) Dreißig Jahre Chromatographie. Monatsh. Chem. **68,** 68 (1936).

— (2) Untersuchungen über den Paprika-Farbstoff VII. Adsorptionsanalyse des Pigments. Liebigs Ann. **509,** 269 (1934).

— (3) Untersuchungen über den Paprika-Farbstoff VIII. Zur Konstitution des Capsanthins und Capsorubins. Liebigs Ann. **516,** 30 (1935).

— (4) Untersuchungen über den Paprika-Farbstoff IX. Partieller Abbau des Capsanthins. Liebigs Ann. **523,** 101 (1936).

— (5) Über einen neuen Farbstoff mit Lycopin-Spektrum. Naturwiss. **23,** 407 (1935).

— (6) Lycoxanthin und Lycophyll, zwei natürliche Derivate des Lycopins. Ber. Dtsch. chem. Ges. **69,** 422 (1936).

ZECHMEISTER, L., L. v. CHOLNOKY u. E. UJHELYI: Beitrag zur Chromatographie von farblosen Substanzen. Bull. Soc. Chim. biol. **18,** (1936) [im Druck].

ZECHMEISTER, L. u. P. TUZSON: (1) Zur Kenntnis der tierischen Fettfarbstoffe. Ber. Dtsch. chem. Ges. **67,** 154 (1934).

— (2) Über den Farbstoff der Sonnenblume (II. Mitt.). Ber. Dtsch. chem. Ges. **67,** 170 (1934).

— (3) Das Pigment der Cucurbita maxima Duch. (Riesenkürbis). Ber. Dtsch. chem. Ges. **67,** 824 (1934).

— (4) Isolierung des Lipochroms aus Hühner- und Pferdefett. Einige Beobachtungen an menschlichem Fett. Ztschr. physiol. Chem. **225,** 189 (1934).

— (5) Beitrag zum Lipochrom-Stoffwechsel des Pferdes. Ztschr. physiol. Chem. **226,** 255 (1934).

— (6) Biochemischer Beitrag zum Studium der Farbstoffe des menschlichen Fettes. Bull. Soc. Chim. biol. **17,** 1110 (1935).

— (7) Zur Kenntnis des Lipochroms höherer Tiere und des Menschen. Naturwiss. **23,** 680 (1935).

— (8) Isolierung von Komponenten des menschlichen Lipochroms. Ztschr. physiol. Chem. **231,** 259 (1935).

— (9) Über den Lipochrominhalt der menschlichen Leber. Ztschr. physiol. Chem. **234,** 241 (1935).

— (10) Zur Kenntnis der selektiven Aufnahme von Carotinoiden im Tierkörper (zugleich II. Mitt. über den Lipochrom-Stoffwechsel des Pferdes). Ztschr. physiol. Chem. **234,** 235 (1935).

ZECHMEISTER, L. u. P. TUZSON: (11) Über das Lipochrom des Wasserfrosches (Rana esculenta). Ztschr. physiol. Chem. **238**, 197 (1936).

— (12) Notiz über das Lipochrom der Schweineleber. Ztschr. physiol. Chem. **239**, 147 (1936).

— (13) Zur Kenntnis des Mandarinenpigments II. Ztschr. physiol. Chem. **240**, 191 (1936).

— (14) Über das Polyenpigment der Orange (I. Mitt.). Ber. Dtsch. chem. Ges. **69**, 1878 (1936).

ZSCHEILE, F. P. jun.: Eine verbesserte Methode zur Reinigung des Chlorophylls a und b; quantitative Messung ihrer Adsorptionsspektren; Beweis für das Vorhandensein einer dritten Chlorophyllkomponente. Bot. Gaz. **95**, 529 (1934).

Namenverzeichnis.

Sachverzeichnis.